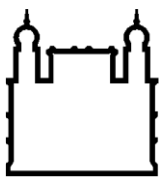


**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**  
**Mestrado em Biociências e Biotecnologia**

**LETÍCIA WERZEL BASSAI**

**CONSTRUÇÃO DE FERRAMENTAS MOLECULARES BASEADAS EM  
CRISPR/Cas9 PARA A CORREÇÃO DA MUTAÇÃO F508DEL CAUSADORA DE  
FIBROSE CÍSTICA**

**CURITIBA/PR**  
**2021**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**  
**Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**

LETÍCIA WERZEL BASSAI

CONSTRUÇÃO DE FERRAMENTAS MOLECULARES BASEADAS EM  
CRISPR/Cas9 PARA A CORREÇÃO DA MUTAÇÃO F508DEL CAUSADORA DE  
FIBROSE CÍSTICA

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos  
Chagas como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Biociências  
e Biotecnologia.

Orientadoras: Dra. Patrícia Shigunov  
Dra. Lia Carolina A. Soares de Medeiros Kuczera

**CURITIBA/PR**

**2021**

Bassai, Letícia Werzel .

Construção de ferramentas moleculares baseadas em CRISPR/Cas9 para a correção da mutação F508del causadora de fibrose cística / Letícia Werzel Bassai. - Curitiba, 2021.

135 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2021.

Orientadora: Patrícia Shigunov.

Co-orientadora: Lia Carolina Almeida Soares de Medeiros Kuczera.

Bibliografia: f. 126-133

1. Fibrose Cística. 2. CRISPR/Cas9. 3. F508del . 4. correção genética . I.  
Título.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ - PARANÁ**  
**Instituto Carlos Chagas**

Ata da Sessão Pública de exame de dissertação para obtenção do grau de Mestre em  
Biotecnologia e Biociências.

Aos 12 dia do mês de março de dois mil e vinte e um, às 09:00 horas, **através de teleconferência pelo link <https://us02web.zoom.us/j/5953384663>**, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dra. Fabíola Barbieri Holetz, Dra. Daniela Fiori Gradia e Dr. Gilberto Vinícius Pereira de Melo, com a finalidade de julgar a dissertação da candidata **Letícia Werzel Bassai**, intitulada: **“Construção de ferramentas moleculares baseadas em CRISPR/Cas9 para correção da mutação F508del causadora da Fibrose Cística”**, sob a orientação de **Dra. Patrícia Shigunov e Dra. Lia Carolina Soares Medeiros Kuczera**, para obtenção do grau de **Mestre** em Biociências e Biotecnologia. A candidata teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pela Presidente **Dra. Fabíola Barbieri Holetz**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o(a) candidato(a), os membros da banca examinadora deliberaram pela:

- ( X ) Aprovação da dissertação por unanimidade  
( ) Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).  
( ) Reprovação da dissertação

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pela candidata.

Curitiba, 12 de março de 2021

**Dra. Fabíola Barbieri Holetz – ICC/FIOCRUZ**

**Dra. Daniela Fiori Gradia – UFPR**

**Dr. Gilberto Vinícius Pereira de Melo – UFPR**

**Candidato(a): Letícia Werzel Bassai**

*“O otimista é um tolo.  
O pessimista, um chato.  
Bom mesmo é ser um realista esperançoso”.*  
Ariano Suassuna

Ao Márcio Werzel, eu dedico o meu melhor hoje e sempre.

Amo você e sempre estarei contigo.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus e à minha família, em especial aos meus pais, Leni e Márcio, por acreditarem em mim com paciência e dedicação me ajudando em todos os aspectos possíveis. Ao Lucas, por me acompanhar e motivar em todos os momentos e aos meus irmãos, Sabrina e Márcio, que me dão motivos para continuar. Às minhas amigas Anna Beatriz e Joyce. Obrigada por estarem comigo sempre. .

Agradeço às minhas orientadoras, Dra. Patrícia e Dra. Lia Carolina, por acreditarem em mim e me ajudarem a cumprir os desafios, compartilhando conhecimentos e compreendendo minhas dificuldades. À minha banca de acompanhamento, Dr. Marco e Dr. Márcio, por toda ajuda e sugestão durante o desenvolvimento do projeto. Aos membros da banca que aceitaram avaliar e revisar este trabalho: Dr. Gilberto Vinícius Pereira, Dra. Daniela Fiori Gradia e Dra. Fabíola Holetz, Dra Lyris Godoy e Dr. Marco Stimamiglio.

Aos chefes do laboratório de células-tronco, Dr. Bruno Dallagiovanna e Alejandro Correa, por me receberem no laboratório desde o estágio e contribuírem para minha formação. Aos demais pesquisadores do grupo, Alessandra, Marco, Bruna e Anny por me receberem no grupo e por todas sugestões e orientações.

À toda a equipe do Instituto Carlos Chagas e da Fiocruz, do preparo e às plataformas tecnológicas de Citometria (ICC), Microscopia Confocal (ICC) e Sequenciamento por todo auxílio técnico, especialmente o Rodrigo, a Bruna e a Anny pela disposição e paciência. Agradeço ao Dr. Miqueias Pacheco da UFRJ pelo envio do material que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Valdez Jamur, do Núcleo de Terapia Celular da PUC/PR, pela realização da cariotipagem.

Gostaria de dedicar um agradecimento especial para Crisciele por toda ajuda e pela amizade. À Anny, Jaqueline Rosa, Isabela e Maria Júlia por toda orientação, esclarecimentos e conselhos científicos que me ajudaram muito nesta jornada. Agradeço à Ariane, à Annanda, à Giuliana por todo carinho, amizade e apoio que foram muito importantes para mim. A realização deste trabalho não seria possível sem vocês. À toda equipe do Labcet: Jhonatan,

Rubens, Amanda, Ana Paula, Cíntia, Hellen, Evelin, Bruna F. Rhaíza, Bruno, Isabelle, Bernardo e a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Agradeço aos laboratórios de imunoquímica e de processos biotecnológicos da UFPR, em especial a Dra. Larissa Alvarenga e Dra. Adriane Medeiros por contribuírem significativamente pela minha formação científica.

Às agências de fomento e fontes financiadoras deste projeto, ao Programa Inova Fiocruz, Fundação Araucária, CAPES e CNPq.



## INSTITUTO CARLOS CHAGAS

### CONSTRUÇÃO DE FERRAMENTAS MOLECULARES BASEADAS EM CRISPR/Cas9 PARA A CORREÇÃO DA MUTAÇÃO F508DEL CAUSADORA DE FIBROSE CÍSTICA

#### RESUMO DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Letícia Werzel Bassai

A fibrose cística (FC) é uma doença genética, autossômica recessiva causada por mutações no gene CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). A proteína CFTR está presente na membrana apical de células epiteliais e funciona como um canal de íons cloro e bicarbonato mantendo o equilíbrio de água no meio extracelular. Existem mais de 2000 mutações descritas para FC, sendo a mutação F508del a mais comum, com cerca de 70% de prevalência mundial. Atualmente, a doença não tem cura, sendo tratados os principais sintomas, isso faz com que a expectativa de vida seja, em média, 40 anos. Na tentativa de se desenvolver novas abordagens terapêuticas, a técnica de CRISPR/Cas9 se apresenta muito promissora, pois possibilita o reconhecimento e clivagem de uma sequência específica de DNA, ativando pela própria célula o mecanismo de reparo de dano no DNA, que na presença de um DNA com a sequência correta, pode corrigir a mutação. O objetivo deste trabalho é construir ferramentas moleculares para corrigir a mutação F508del de fibrose cística em linhagem celular de epitélio pulmonar (CFBE). O trabalho é dividido em três etapas principais: (1) Construção de ferramentas; (2) Melhora do reparo dirigido por homologia e (3) avaliação da edição. Na primeira etapa foram selecionados desenhos de sgRNA específicos, com softwares de predição, para a mutação F508del do gene CFTR. Os desenhos foram selecionados com base na proximidade da mutação, quantidade e localização de *off-targets* e eficiência predita *in silico*. Em sequência, foram construídas as ferramentas moleculares sendo uma baseada no plasmídeo (px458) que contém as sequências do sgRNA, da proteína SpCas9 e do gene RFP. A inserção da sequência do sgRNA no plasmídeo foi confirmada pela técnica de PCR, digestão com enzimas de restrição e sequenciamento. O método de transfecção selecionado foi por agentes lipídicos, apresentando eficiência de cerca 9% na entrada do plasmídeo na célula alvo. A ferramenta construída, ribonucleoproteína, teve o RNA obtido por transcrição *in vitro* e purificado. Após a formação do complexo com a proteína purificada (SaCas9) esta ferramenta mostrou atividade (30%) em reconhecer e clivar o DNA *in vitro*. A segunda etapa consistiu em tentar melhorar o reparo dirigido por homologia através da sincronização do ciclo celular, para isto foi selecionada a droga hidroxiureia na concentração de 46,80µg/mL que em 24 horas apresentou sincronização das células (60% na fase G2), porém não foi possível realizar o sorting. A terceira etapa consistiu em testar as ferramentas e avaliar a correção por PCR, qPCR e sequenciamento. Aplicando a metodologia descrita após 48 horas de transfecção das células, foi feita uma triagem por citometria de fluxo e a correção confirmada por técnicas de qPCR, a detecção da correção da mutação F508del foi inferior a 12,5% ou nula, nas condições testadas. Novos ensaios serão realizados com modificação do projeto.

**Palavras-chave:** Fibrose Cística; CRISPR/Cas9; F508del; correção genética

## ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is a genetic, autosomal recessive disease caused by mutations in the CFTR gene (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). The CFTR protein is present in the apical membrane of epithelial cells and functions as a channel of chlorine and bicarbonate ions maintaining the balance of water in the extracellular medium. In CF patients, mucus is very viscous, which allows it to accumulate on the surface of tissues, especially the lungs. There are more than 2000 mutations described for CF, with the F508del mutation being the most common, with around 70% prevalence worldwide. Currently, the disease has no cure, the main symptoms being treated, this makes life expectancy on average 40 years. In an attempt to develop new therapeutic approaches, the CRISPR/Cas9 technique is very promising, as it allows the recognition and cleavage of a specific DNA sequence, activating the DNA damage repair mechanism by the cell itself, which in the presence of a DNA with the correct sequence, can correct the mutation. The objective of this work is to build molecular tools to correct the F508del mutation of cystic fibrosis in a pulmonary epithelial cell line (CFBE). The work is divided into three main stages: (1) Construction of tools; (2) Improvement of homology-directed repair and (3) edition evaluation. In the first stage, specific sgRNA designs were selected, with prediction software, for the F508del mutation of the CFTR gene. The designs were selected based on the proximity of the mutation, number and location of *off-targets* and efficiency predicted *in silico*. In sequence, molecular tools were built, one based on the plasmid (px458) that contains the sequences of the sgRNA, the protein SpCas9 and the RFP gene. The insertion of the sgRNA sequence in the plasmid was confirmed by the PCR technique, digestion with restriction enzymes and sequencing. The transfection method selected was by lipid agents, showing an efficiency of about 9% in the entry of the plasmid into the target cell. The built tool, ribonucleoprotein, had the RNA obtained by *in vitro* transcription and purified. After the formation of the complex with the purified protein (SaCas9) this tool showed activity (30%) in recognizing and cleaving DNA *in vitro*. The second step consisted of trying to improve homology-directed repair through cell cycle synchronization, for which the hydroxyurea drug at a concentration of 46.80 $\mu$ g / mL was selected, which in 24 hours showed cell synchronization (60% in the G2 phase), however, it was not possible to perform the sorting, after transfection, due to low cell viability. The third step consisted of testing the tools and evaluating the correction by PCR, qPCR and sequencing. After 48 hours transfection cells, was made a sorting by flow cytometry and the correction confirmed by qPCR techniques, the detection the correction of the F508del mutation was below 12.5% or null, under the conditions tested. New assays will be performed included design modifications for this tool to obtain satisfactory data.

Keywords: cystic fibrosis; CRISPR/Cas9; F508del; genetic correction

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1– Estrutura do canal CFTR.....	21
Figura 1.2 - Diferentes classes das mutações no gene CFTR. ....	23
Figura 1.3 – Efeitos decorrentes dos defeitos no canal CFTR. ....	27
Figura 1.4- Funcionamento do sistema CRISPR em bactérias. ....	37
Figura 1.5- Componentes e mecanismo básico necessário para aplicação do CRISPR. ....	40
Figura 3.1 - Localização da mutação F508del no gene CFTR. ....	44
Figura 3.2 Sequência dos sgRNAs com o sítio da enzima BbsI.....	45
Figura 3.3 Estrutura do DNA sintetizado para ser transcrito em sgRNA. ....	51
Figura 3.4 – Estratégia de estabelecimento de gates de acordo com o modelo de Dean Jett Fox no software FlowJo.....	57
Figura 4.1- Fluxograma geral mostrando as etapas realizadas no desenvolvimento do trabalho .....	62
Figura 4.2 Desenho esquemático representando o plasmídeo px458. ....	68
Figura 4.3 Confirmação da construção do plasmídeo px458 com as sequências de sgRNA por diferentes estratégias.. ....	69
Figura 4.4 – Transfecção por eletroporação usando os tampões OPTIMEM e TsbBuffer e 2µg do plasmídeo pmax.. ....	71
Figura 4.5 – Transfecção por eletroporação usando os tampões OPTIMEM, TsbBuffer e DMEM com 2µg do plasmídeo px458. ....	73
Figura 4.6 – Gráfico comparando as condições de transfecção pelo método de eletroporação.....	74
Figura 4.7 –Transfecção com o plasmídeo px458 usando Lipofectamina 3000.. ....	76
Figura 4.8 - Gráfico comparando as condições de transfecção do plasmídeo px458 com Lipofectamina 3000. ....	77
Figura 4.9-Confirmação da inserção da sequência no locus do plasmídeo pGEM-T. ....	79
Figura 4.10 Confirmação da purificação da molécula de RNA que contém a sequência do sgRNA e tracrRNA para ancoramento da SaCas9.....	80
Figura 4.11 Reação de clivagem in vitro usando fragmento de 906 pb do gene CFTR. ....	83
Figura 4.12 Porcentagem de clivagem do substrato nas diferentes proporções testadas: 5:5:1; 10:10:1 e 20:20:1.. ....	84

Figura 4.13 Ensaio de viabilidade celular após 24 horas de exposição às drogas. .....	88
Figura 4.14– Média da Porcentagem relativa da quantidade de células em cada fase do ciclo celular (controle) e tratados com nocodazol e hidroxiureia após 2 e 24 horas de recuperação. ....	90
Figura 4.15- Porcentagem de células CFBE em cada fase do ciclo celular após 2 horas de recuperação. ....	91
Figura 4.16 - Porcentagem de células CFBE em cada fase do ciclo celular após 24 horas de recuperação. ....	91
Figura 4.17- Marcação do canal CFTR. ....	93
Figura 4.18– Imunofluorescência com anticorpo mAb 596 para marcação do CFTR com diferentes métodos de fixação e permeabilização.....	94
Figura 4.19– Imunofluorescência com anticorpo mAb 596 para marcação do CFTR em células CFBE 508del, HUVEC e célula-tronco mesenquimal (CTM).....	95
Figura 4.20 Sequenciamento de DNA pelo método de Sanger.....	97
Figura 4.21– PCR em gel de agarose mostrando a detecção no DNA da ausência da mutação F508del com primers específicos.....	98
Figura 4.22 Detecção no DNA da ausência da mutação F508del por qPCR. ....	100
Figura 4.23 Curva de diluição de DNA de célula-tronco para correlacionar concentração de DNA com o ciclo de amplificação como forma de prever a eficiência dos <i>primers</i> . ....	101
Figura 4.24 Transfecção das células CFBE (508del) com plasmídeo px458 contendo ou não a sequência dos sgRNAs usando Lipofectamina 3000. ....	102
Figura 4.25 Verificação da correção da mutação por PCR em células que receberam o sistema CRISPR. ....	103
Figura 4.26 Detecção no DNA da correção da mutação F508del por qPCR.. ....	104
Figura 4.27 Cromatograma obtido após sequenciamento pelo método de Sanger das amostras submetidas ao CRISPR.....	105
Figura 4.28- Alinhamento das sequências das células CFBE508del .....	106
Figura 4.29- Gráfico mostra a porcentagem de eventos de inserção e deleção comparados a sequência controle (CFBE508del). ....	107
Figura 4.30 Verificação da correção da mutação por PCR em células que receberam o sistema CRISPR por PCR. ....	108
Figura 4.31 -. Curvas de amplificação e melting .....	109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1- Principais mutações identificadas no gene CFTR. ....	22
Tabela 3.1 – Elementos da reação de clivagem <i>in vitro</i> . ....	54
Tabela 3.2– Concentração de hidroxiiureia testada no ensaio de viabilidade celular .....	56
Tabela 3.3 – Concentrações de DNA selvagem para averiguar o limite de detecção da técnica de qPCR .....	59
Tabela 4.1- Características teóricas dos sgRNAs selecionados pelos programas CHOCHOP e EuPadget.....	64
Tabela 4.2 Rendimento da reação de transcrição <i>in vitro</i> após a purificação do RNA. ....	81
Tabela 4.3 Fragmentos esperados após clivagem do DNA (substrato) de 906 pb pela enzima SaCas9.....	82
Tabela 4.4 Resumo das condições de transfecção do complexo RNP. ....	85
Tabela 4.5 Moléculas descritas na literatura que aumentam a frequência do reparo dirigido por homologia (HDR) em diferentes células. ....	87
Tabela 4.6- Porcentagem de <i>indels</i> gerados por cada sgRNA .....	107

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AAV5</b>	Adenovírus associado sorotipo 5
<b>AME</b>	Atrofia muscular espinhal
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina ( <i>Adenosine triphosphate</i> )
<b>ATTR</b>	Transtirretina amiloidose
<b>BRCA1</b>	<i>Breast cancer 1 gene</i>
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovina ( <i>Bovine serum albumin</i> )
<b>BSS-CMF</b>	Solução salina balanceada, sem sais de cálcio e magnésio
<b>cAMP</b>	Adenosina 3',5'-monofostado cíclico ( <i>Cyclic adenosine 3', 5' – monophosphate</i> )
<b>CEP290</b>	Proteína do centróssomo 290
<b>CDS</b>	<i>Coding sequence</i> (Região codificadora do gene)
<b>CFTR</b>	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
<b>CFBE</b>	<i>Human CF Bronchial Epithelial Cell Line</i> (Linhagem celular de epitélio pulmonar de fibrose cística)
<b>Chip-Seq</b>	Sequenciamento da imunoprecipitação da cromatina
<b>CHK2</b>	<i>Checkpoint kinase 2 gene</i>
<b>CNTBio</b>	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
<b>CRISPR</b>	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
<b>CTM</b>	Células-tronco mesenquimais
<b>DAPI</b>	4'6'diamidino-2-fenilindol dihidroclorido
<b>DMEM</b>	Meio Dulbecco's Eagle modificado
<b>DNA</b>	Ácido desoxibonucleico
<b>DOPE</b>	<i>Dioleoylphosphatidylethanolamine</i>
<b>dPCR</b>	<i>Digital polymerase chain reaction</i> (reação de polimerase em cadeia digital)
<b>DSB</b>	<i>Double-strand break</i> (Quebra na dupla-fita do DNA)
<b><i>E.coli</i></b>	bactéria <i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilendiaminotetracético)
<b>ENaC</b>	Canal de sódio epitelial
<b>ER</b>	Retículo endoplasmático
<b>FC</b>	Fibrose Cística
<b>FDA</b>	<i>Food and Drugs Administration</i>
<b>HEK293</b>	<i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i> (Linhagem celular de rim de embrião)

<b>HBECs</b>	<i>Human bronchial epithelial cells</i> (Células epiteliais de brônquios)
<b>HDR</b>	<i>Homology directed repair</i> (Reparo Dirigido por Homologia)
<b>HIV</b>	Human immunodeficiency vírus (Vírus da imunodeficiência humana)
<b>IF</b>	Imunofluorescência
<b>INPI</b>	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
<b>iRNA</b>	ácido ribonucleico de interferência
<b>iPSC</b>	Célula-tronco pluripotente induzida
<b>IRT</b>	Tripsinogênio Imunorreativo
<b>iTOP</b>	<i>Technology for protein delivery into cells</i> (tecnologia para entrega de proteínas em células)
<b>kb</b>	kilo bases
<b>kDa</b>	kilo Daltons
<b>LCA10</b>	Amaurose congênita de Leber
<b>LB</b>	Luria Bertani (meio de cultura)
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>MMEJ</b>	<i>Microhomology-mediated end joining</i> (Junção mediada por microhomologia)
<b>MSD</b>	<i>Membrane spanning domains</i> (Domínios de membrana)
<b>NBD</b>	<i>Nucleotide binding domains</i> (domínio de ligação de nucleotídeos)
<b>NHEJ</b>	<i>Non-homologous end joining</i> (Junção das extremidades não-homólogas)
<b>PAM</b>	<i>Protospacer adaptor motif</i> (Motivo adjacente ao Protospacer)
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação de polimerase em cadeia)
<b>PE</b>	Ficoeritrina ( <i>Phycoerythrin</i> )
<b>PKA</b>	proteína kinase A
<b>PKC</b>	proteína kinase C
<b>p53</b>	proteína tumoral TP53
<b>PNTN</b>	Programa Nacional de Triagem Neonatal
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase quantitativa)
<b>RD</b>	Domínio Regulador

<b>RDC</b>	Resolução de Diretoria Colegiada
<b>REBRAFC</b>	Registro Brasileiro de Fibrose Cística
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNP</b>	Ribonucleoproteína
<b>RPA</b>	Proteína de replicação A
<b>RPE</b>	Epitélio pigmentar da retina
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de acrilamida em condições desnaturantes
<b>SFB</b>	Soro Bovino Fetal
<b>sgRNA</b>	<i>Single-guide</i> RNA (RNA guia)
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TALEN</b>	<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>
<b>UK CFGTC</b>	<i>UK Cystic Fibrosis Gene Therapy</i> – Consórcio de Terapia Gênica para Fibrose Cística do Reino Unido
<b>VX-770</b>	Ivacaftor
<b>VX-809</b>	Lumacaftor
<b>WIPO</b>	<i>World Intellectual Property Organization</i>
<b>WB</b>	Western Blot
<b>ZINC-FINGER</b>	Nucleases dedos de zinco



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Doenças Raras .....	18
1.2	Prevalência .....	19
1.3	Gene e proteína CFTR.....	20
1.4	Mutações da Fibrose Cística.....	22
1.5	Mutação F508del .....	24
1.6	Sintomas .....	25
1.7	Diagnóstico .....	27
1.8	Tratamento.....	28
1.9	Custos.....	30
1.10	Terapia Gênica.....	31
1.11	Custos da Terapia Gênica.....	34
1.12	Ferramentas de Edição Gênica na Fibrose Cística.....	35
1.13	Justificativa.....	42
2	OBJETIVOS.....	43
2.1	OBJETIVO GERAL .....	43
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
3	METODOLOGIA .....	44
3.1	CONSTRUÇÃO DE FERRAMENTAS.....	44
3.1.1	Desenho do sgRNA e Mapeamento dos <i>off-targets</i> .....	44
3.1.2	Construção do sgRNA no plasmídeo px458.....	45
3.1.3	Padronização do Método de Transfecção para o plasmídeo.....	48
3.1.4	Construção do sgRNA para entrega da ribonucleoproteína .....	51
3.1.5	Reação de clivagem de DNA pelo complexo in vitro .....	53
3.1.6	Padronização da Transfecção da Ribonucleoproteína .....	54
3.2	Sincronização do Ciclo Celular .....	55
3.3	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE DETECÇÃO .....	57
3.3.1	Extração DNA das células .....	57
3.3.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção da mutação F508del .....	58
3.3.3	Imunofluorescência.....	59
3.3.4	Avaliação da Edição .....	60
4	RESULTADOS .....	62

4.1	Etapa 1 – Construção de Ferramentas .....	63
4.1.1	Desenho do sgRNA e mapeamento de off-targets .....	63
4.1.2	Sequência do DNA doador .....	66
4.1.3	Construção do sgRNA no plasmídeo.....	67
4.1.4	Padronização do método de transfecção para plasmídeo.....	70
4.1.5	Construção do sgRNA para entrega da Ribonucleoproteína.....	78
4.1.6	Clonagem da sequência no pGEM-T.....	78
4.1.7	Transcrição <i>in vitro</i> para obtenção do RNA .....	80
4.1.8	Reação de clivagem <i>in vitro</i> .....	82
4.1.9	Transfecção do Complexo Ribonucleoproteico .....	85
4.2	Etapa 2 – Aumento do Reparo Dirigido por Homologia (HDR) .....	86
4.2.1	Sincronização do Ciclo Celular .....	88
4.3	Etapa 3 – Detecção selvagem e mutante.....	92
4.3.1	Padronização do teste de detecção (imunofluorescência) .....	92
4.3.2	Detecção a nível de DNA por PCR convencional .....	96
4.3.3	Quantificação das edições por PCR quantitativa (qPCR).....	98
4.3.4	Transfecção do plasmídeo e avaliação da correção.....	101
4.3.5	Transfecção da Ribonucleoproteína .....	108
5	DISCUSSÃO.....	110
5.1	Construção de Ferramentas.....	110
5.2	Sincronização do Ciclo Celular .....	112
5.3	Abordagens de Detecção.....	113
5.4	Comparação de técnicas e resultados .....	115
6	CONCLUSÕES.....	121
7	PERSPECTIVAS .....	123
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	124
	ANEXOS .....	133
	ANEXO A.....	133
	ANEXO B.....	134

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doenças Raras

De acordo com dados do Ministério da Saúde, considera-se doença rara aquela que afeta até 65 pessoas em cada 100.000 indivíduos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Embora não seja conhecido o número exato de doenças raras, estimam-se cerca de 7.000 e o critério usado para definir o padrão da doença depende, exclusivamente, da avaliação médica. No inventário online sobre doenças raras Orphanet (<https://www.orpha.net/>) a complexidade da doença é ponderada nas diversas classificações presentes. Cerca de 80% das doenças raras estão relacionadas a fatores genéticos e os sintomas são, geralmente, observados ao nascimento e infância (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Não obstante, mais de 50% das doenças raras manifestam-se na idade adulta, como as doenças de Huntington, Crohn e Charcot-Marie-Tooth, esclerose lateral amiotrófica, sarcoma de Kaposi entre outras. A maior parte das doenças raras são consideradas crônicas e progressivas graves, fazendo com que cerca de 30% dos pacientes acometidos morram antes dos cinco anos de idade (ORPHANET, 2020). A fibrose cística (FC) é a doença rara mais comum e atinge cerca de 90 mil pessoas em todo mundo (LOPES-PACHECO, 2020) com cerca de 1000 novos casos são diagnosticados todo ano.

A fibrose cística é uma doença genética, monogênica e autossômica recessiva causada por mutações no gene CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (CUTTING, 2015). A doença é conhecida popularmente como mucoviscidose ou “doença do beijo salgado” devido a característica do suor do portador ser mais salgado que o normal, em decorrência do desequilíbrio iônico (LOPES-PACHECO, 2016). Estima-se que a doença tenha origem no início da Idade do Bronze, há cerca de 5 mil anos, na região que hoje corresponde à Europa (FARRELL, 2018). Embora a fisiopatologia fosse conhecida, foi a patologista Dorothy Andersen, apenas em 1938, que denominou a doença de “fibrose cística do pâncreas”. O nome da doença foi escolhido com

base em autópsias de crianças que tinham morrido da má nutrição, sendo que em todas foram encontrados cistos e fibrose no pâncreas (KEREM, 1989)

A proteína CFTR é um canal presente na superfície apical das células epiteliais, sendo responsável pelo transporte de íons cloro e bicarbonato, pela manutenção da homeostase, equilíbrio iônico e pH no microambiente (RATJEN et al., 2015). Quando o gene CFTR possui mutações, a proteína de mesmo nome não é funcional resultando em defeitos no transporte de íons acoplado a maior reabsorção de sódio, que altera as propriedades físico-químicas do muco (ROSA et al., 2008). A desidratação confere muco com maior espessura e viscosidade resultando no acúmulo e obstrução da superfície das células epiteliais (VEIT et al., 2016). O quadro clínico é associado a órgãos exócrinos sendo afetados os sistemas respiratórios, digestivos e reprodutor. Atualmente, a doença não tem cura, sendo tratados os principais sintomas.

## **1.2 Prevalência**

A FC é mais comum em caucasianos, sendo que 1 em cada 25 caucasianos é portador de alguma mutação no gene CFTR (SANDERS; FINK, 2016). Na Europa, a frequência média varia entre 1/3000 e 1/6000 afetados, dependendo da região do continente (SCOTET; L'HOSTIS; FÉREC, 2020). Alguns países apresentam frequências semelhantes à Europa, sendo a prevalência da doença de 1/4000 nos Estados Unidos e no Canadá 1/3300 (SCOTET; L'HOSTIS; FÉREC, 2020), mas em outras regiões do mundo a fibrose cística ocorre com menor frequência, sendo 1/4.000 a 1/10.000 em latino-americanos, 1/15.000 a 1/20.000 em afro-americanos (MIRTAJANI et al., 2017). Ainda, a prevalência é pouco descrita nos países asiáticos, com 1/35.000 no Japão e estimada entre 1/10.000 e 1/100.000 na Índia (SCOTET; L'HOSTIS; FÉREC, 2020).

No Brasil, em 2009, foi criado o Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC) e a incidência da doença começou a ser documentada. Nas estatísticas são contabilizados apenas pacientes cadastrados em centros específicos de tratamento e em média 1 a cada 10 mil pessoas apresentam fibrose cística. No entanto, o Brasil apresenta frequência observada variável de acordo com a região do país: 1/1.587 até 1/32.258 nascidos vivos (RIQUENA et al., 2019). Estima-se que a frequência da doença no Paraná, Santa Catarina, Rio

Grande do Sul e São Paulo é mais próxima da população europeia, cerca de um afetado em cada 2500 recém-nascidos (SCHNEIDER-FUTSCHIK, 2019), decrescendo em direção ao norte e nordeste do país (ROSA et al., 2008). De acordo com o levantamento REBRAFC, realizado em 2017 com 5.128 pacientes, o Brasil apresenta cerca de 474 registros novos por ano. O estado de São Paulo apresenta o maior número de pacientes com 25,1 % do total, seguido de Minas Gerais (11,9%) e Rio Grande do Sul (9,8%). A região sudeste apresenta 47,5% dos portadores, a região sul com 21%, nordeste com 16,9%, centro-oeste com 6,0% e norte com 4,6%.

Estima-se que a expectativa de vida seja em torno de 40 anos no Canadá e alguns países da Europa (SANDERS; FINK, 2016), porém a idade mediana da morte entre indivíduos com FC seguido nos registros de pacientes nos Estados Unidos e no Reino Unido foi de 27 a 28 anos em 2012 (VANDEVANTER et al., 2016). Para os nascidos na última década, com a implantação do diagnóstico precoce através da triagem neonatal, a expectativa de vida pode superar os 50 anos (DAMACENO, 2020). No Brasil, em 2017, foram relatados 50 óbitos com uma mediana da idade de 15,7 anos e 86% dos óbitos são decorrentes de causas respiratórias (REBRAFC, 2017).

### **1.3 Gene e proteína CFTR**

O gene CFTR foi clonado por Riordan e colaboradores (1989) e representou um grande avanço para o início dos estudos sobre a doença. O gene CFTR está localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q31.2), com cerca de 190 kb de DNA genômico em 27 éxons que transcreve um RNA mensageiro de 6,5 kb (RIORDAN et al., 1989), sendo então traduzido em uma proteína de peso molecular de 168 kDa e 1480 aminoácidos (MEEGEN et al., 2013a). Após o dobramento e as modificações pós-traducionais a proteína sofre uma glicosilação parcial no retículo endoplasmático (ER), trafega para o complexo de Golgi, onde será totalmente glicosilada, se dirigindo a membrana plasmática das células epiteliais onde desempenhará sua função (LOPES-PACHECO, 2020).

A proteína CFTR está presente na superfície apical de células epiteliais e pertence à superfamília do cassete de ligação ATP (ABC), todavia é o único entre as proteínas da mesma família que atua como um canal iônico (HWANG et al.,

2018). Esse canal iônico é ativado por adenosina monofosfato cíclico (cAMP) com preferência pelo cloreto, mas também pode atuar regulando outros canais iônicos, como o canal epitelial de sódio (ENaC), canal externo de cloreto, canal regulador de potássio, secreção de íons bicarbonato (MEEGEN et al., 2013b), além do transporte de proteínas, produção de óxido nítrico e mecanismos de liberação de ATP (LOPES-PACHECO, 2016).

Do ponto de vista estrutural, o CFTR é composto por dois domínios transmembranares (MSD) com seis alfa-hélices hidrofóbicas que atravessam a bicamada lipídica, cada um associado a um domínio de ligação a nucleotídeos (NBD1 e NBD2) que são citoplasmáticos e hidrolisam o ATP, além disso existe um regulador (RD) que deve ser fosforilado para permitir a abertura do canal (REES et al., 2017) conforme apresentado na Figura 1.1.

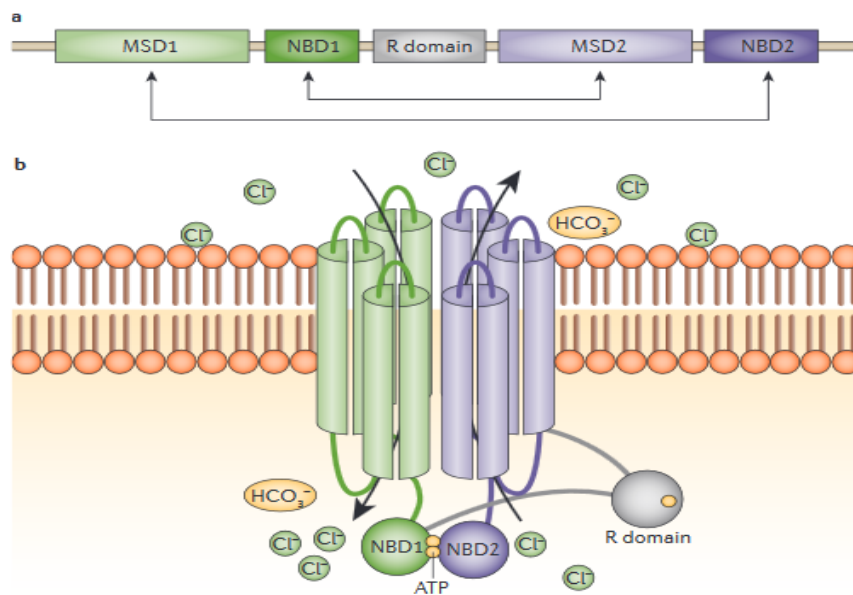


Figura 1.1– Estrutura do canal CFTR. Os domínios funcionais (MSD1, MSD2, RD, NBD1 e NBD2) do canal são evidenciados assim como a passagem dos íons cloro e bicarbonato. Fonte: (RATJEN et al., 2015)

Os domínios NBD são responsáveis pela ligação e hidrólise do ATP e fornecem a energia para a atividade do canal (LOPES-PACHECO, 2016). A ativação do canal CFTR, denominada *gating*, ocorre quando a proteína kinase A (PKA) e a proteína kinase C (PKC) estão fosforiladas no domínio RD e quando moléculas de ATP intracelular se ligam e são hidrolisadas, pelo domínio NBD1, ativando a função de transporte de íons. Em contrapartida, quando há ligação e

hidrólise do ATP pelo domínio NBD2 o canal é fechado (GADSBY; VERGANI; CSANÁDY, 2006). Dessa forma, o canal é responsável por regular o volume de líquido na superfície epitelial através da secreção de cloro e inibição da absorção de sódio fazendo com que defeitos na função da proteína altere drasticamente a homeostase de íons e fluidos nas células epiteliais (MEEGEN et al., 2013b). Disfunções no canal CFTR resultam em conteúdo eletrolítico alterado no meio externo até a superfície das membranas epiteliais levando a deposição espessa de muco, o que é diretamente relacionado com os sintomas da fibrose cística (GELFOND; BOROWITZ, 2013).

#### 1.4 Mutações da Fibrose Cística

Existem mais de 2000 mutações notificadas no *Cystic Fibrosis Mutation Database* (<http://www.genet.sickkids.on.ca>) sendo diferentes tipos de mutações identificados e a frequência com que ocorrem conforme apresentado na Tabela 1.1.

Tipo de Mutação	Frequência (%)
Substituição de um aminoácido ( <i>missense</i> )	38,94
Mudança na matriz de leitura ( <i>frameshit</i> )	16,09
Alteração do <i>Splicing</i>	10,97
Códon stop prematuro ( <i>nonsense</i> )	8,38
Inserções e Deleções ( <i>indels</i> )	4,89
Variação na sequência	12,88
Desconhecida	7,04
Promotor	0,81

Tabela 1.1- Principais mutações identificadas no gene CFTR. Fonte: Disponível em: <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>. Acesso em 01 abril 2020

O sistema de classificação tradicional divide as mutações no CFTR em cinco classes diferentes de acordo com seu efeito na proteína conforme apresentado na Figura 1.2. A classificação ainda apresenta algumas ressalvas, uma vez que nem todas as mutações foram caracterizadas e classificadas. Além disso, ainda que as mutações sejam classificadas em uma mesma classe elas podem apresentar respostas diferentes ao mesmo fármaco (LOPES-PACHECO, 2016).

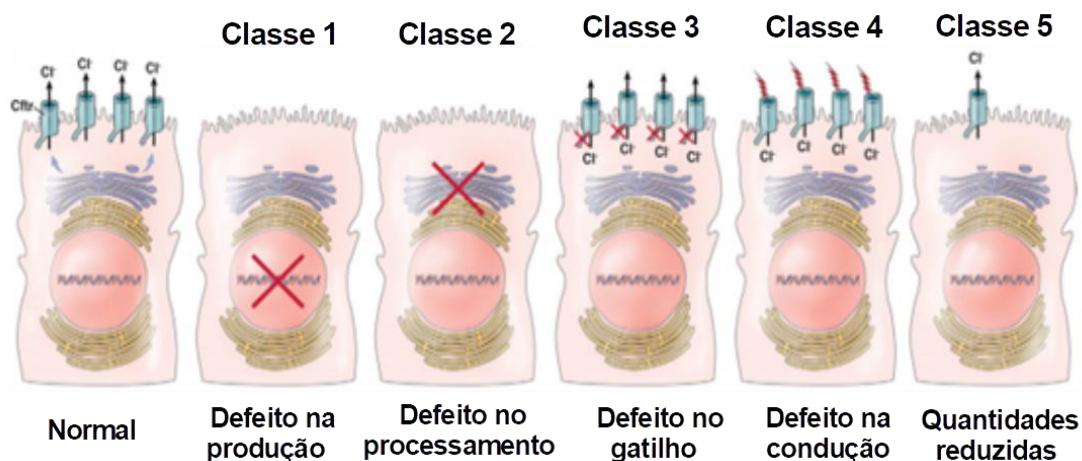


Figura 1.2 - Diferentes classes das mutações no gene CFTR. Classe I (sem síntese da proteína); Classe II (Defeitos no processamento); Classe III (Defeitos no gatilho do canal); Classe IV (Defeito na condutância); Classe V (Quantidade da proteína funcional reduzida). Fonte: Adaptado de (GELFOND; BOROWITZ, 2013)

- As mutações de classe I representam cerca de 9% dos mutantes e são caracterizadas pela falta parcial ou total da proteína funcional (FANEN; WOHLHUTER-HADDAD; HINZPETER, 2014). Isso pode acontecer devido a presença de inserções ou deleções que alteram o quadro de leitura (LOPES-PACHECO, 2016) ou a presença de códon *stop*, em que a proteína não é sintetizada completamente (FANEN; WOHLHUTER-HADDAD; HINZPETER, 2014).
- Mutações de classe II estão associadas ao processamento defeituoso, devido ao dobramento incorreto da proteína (GELFOND; BOROWITZ, 2013) que fica retida no retículo endoplasmático (ER), para posteriormente ser degradada pela via da ubiquitina-proteassomo. A proteína não chega a ser totalmente glicosilada no complexo de Golgi para então ser exportada para a membrana apical da célula onde desempenharia sua função. A mutação F508del é mais prevalente (70%), porém existem outras como G85E (0,4%), I507del (0,5%), R560T (0,2%) e N1303K (1,6%) (LOPES-PACHECO, 2020).
- Mutações de classe III estão localizadas nos domínios de ligação do ATP (NBD1 e NBD2) e são chamadas de mutações de bloqueio, uma vez que a proteína funcional está presente na membrana celular em níveis normais, porém não são ativadas por proteínas kinase A (LOPES-



PACHECO, 2016). Medicamentos como ivacaftor atuam nessas mutações, forçando o canal a permanecer aberto, reduzindo os sintomas da fibrose cística (LOPES-PACHECO, 2020).

- No caso das mutações de classe IV a condução do cloro no canal é prejudicada. Mutações desta classe estão tipicamente associadas com a forma mais branda da doença do ponto de vista sintomático (CUTTING, 2015).
- Por fim, as mutações de classe V resultam em uma quantidade reduzida de proteína CFTR com função normal na membrana celular (LOPES-PACHECO, 2016). Assim, incluem mutações nos locais de *splicing*, induzindo a exclusão parcial ou total de éxons (por exemplo, as mutações 3849 + 10KbC> T e 2789 + 5G> A) (PROESMANS; VERMEULEN; DE BOECK, 2008).

Ainda não se pode inferir completamente a relação do genótipo com o fenótipo da doença, mas em geral, as classes I, II e III tendem a ter a função mínima da proteína e consequências mais graves: insuficiência pancreática, íleo meconial, diabetes, doenças no fígado e acometimento da função pulmonar com infecções recorrentes. Já as mutações de classes IV e V representam as mutações com um fenótipo mais brando, com melhoria do estado nutricional e doença pulmonar menos grave, embora os sintomas ainda persistam (SERRANO, 2016).

### **1.5 Mutação F508del**

A mutação F508del é mais comum em portadores de fibrose cística no mundo: cerca de 70% dos afetados apresentam a mutação, em pelo menos um dos alelos (LOPES-PACHECO, 2020). Cerca de 40% dos pacientes, nos Estados Unidos, apresentam a mutação nos dois alelos (FAJAC; GIRODON, 2020). No Brasil, de acordo com Registro Brasileiro de Fibrose Cística (2017), entre os portadores da doença, cerca de 23,5% apresenta a mutação nos dois alelos. Entretanto, os dados do Brasil ainda não estão completos, uma vez que 34,1% dos pacientes apresentam resultados negativos ou inconclusivos nos exames e o Registro conta apenas com os dados dos pacientes cadastrados nos

centros de referência (REBRAFC, 2017). Além disso, a mutação F508del mostra grande variação na frequência dentro do país, por exemplo: na região sul do Brasil, aproximadamente 52% dos portadores apresenta a mutação F508del nos dois alelos (ROSA et al., 2018), mas nos estados do Rio de Janeiro e Pará as frequências se mostram em torno de 28,42% e de 22,73%, respectivamente. Esses números são explicados devido à grande miscigenação racial no Brasil (NETO, 2009).

A denominação da mutação F508del é devido à deleção de três nucleotídeos (CTT), na posição do aminoácido 508, fenilalanina, da proteína CFTR (MEEGEN et al., 2013b). A mutação F508del afeta a formação da estrutura dentro do primeiro domínio de ligação a nucleotídeos (NBD1), causando instabilidade e dessa forma, tanto a eficiência quanto estabilidade durante dobramento da proteína CFTR ficam comprometidas (ULIYAKINA et al., 2018). Quando o dobramento é incorreto, os mecanismos de controle de qualidade da célula fazem com que esta seja degradada precocemente (PESCE et al., 2016) e não passe pela glicosilação ocasionando os defeitos funcionais. Por esta razão a mutação é classificada como de classe II (VAN MEEGEN et al., 2013). No entanto, uma pequena fração da proteína mutante pode escapar destes pontos de controle de qualidade e alcançar a membrana plasmática, todavia há uma redução considerável na estabilidade e a quantidade na superfície celular, que são características de mutação de classe V (LOPES-PACHECO, 2020).

A proteína mutada pode ser visualizada por ensaios de Western Blot (FARINHA et al., 2004), uma vez que a proteína, dobrada incorretamente, apresenta peso molecular mais baixo (150 kDa), devido à ausência de glicosilação, do que a proteína nativa (168 kDa). Embora seja uma técnica simples e de baixo custo, a detecção é baixa devido aos níveis de expressão muito baixos da proteína (LUKACS et al., 2004; MEEGEN et al., 2013b).

## **1.6 Sintomas**

De acordo com o Ministério da Saúde (2020), os recém-nascidos podem apresentar insuficiência pancreática grave e complicações gastrointestinais relacionadas com fibrose cística. A ausência do canal CFTR

funcional torna a doença multissistêmica (PROESMANS; VERMEULEN; DE BOECK, 2008). O mesmo padrão de sintomas é observado em crianças e adultos, sendo os sintomas mais comuns: esteatorreia (gordura nas fezes), dificuldade de ganho de peso devido à ausência de enzimas digestivas pela obstrução dos ductos pancreáticos pela secreção espessa, dor abdominal recorrente, obstrução intestinal, má absorção, pólipos nasais, pancreatite, aumento do nível de açúcar no sangue e distúrbios dos hormônios do crescimento, além dos problemas respiratórios que incluem tosse persistente com produção de muco, infecções pulmonares recorrentes e infecções bacterianas (MIRTAJANI et al., 2017). Além dos sintomas já citados alguns portadores apresentam danos na glândula sudorípara, no ducto biliar do fígado e no trato reprodutivo masculino (FANEN; WOHLHUTER-HADDAD; HINZPETER, 2014).

Embora os pacientes tenham vários órgãos afetados, a infecção respiratória crônica com dano progressivo do tecido pulmonar leva a morte prematura (VANDEVANTER et al., 2016). Atualmente, a doença pulmonar obstrutiva é a principal causa de morbidade, com cerca de 80% dos casos de morte precoce, podendo ser retardada apenas em sua gravidade (FANEN; WOHLHUTER-HADDAD; HINZPETER, 2014). A principal explicação para doença afetar as vias aéreas é a disfunção mucociliar em que o portador de fibrose cística não consegue limpar efetivamente as bactérias inaladas, conforme mostrado na Figura 1.3. Além disso, há uma resposta inflamatória excessiva aos patógenos, tendo até 10 vezes mais inflamação do que uma pessoa sem FC, com infecção do trato respiratório inferior. Apesar da resposta inflamatória excessiva a patógenos não seja totalmente compreendida, acredita-se que a composição e secreção anormal de muco possam ser fatores que contribuem para o quadro clínico (LOPES-PACHECO, 2016).

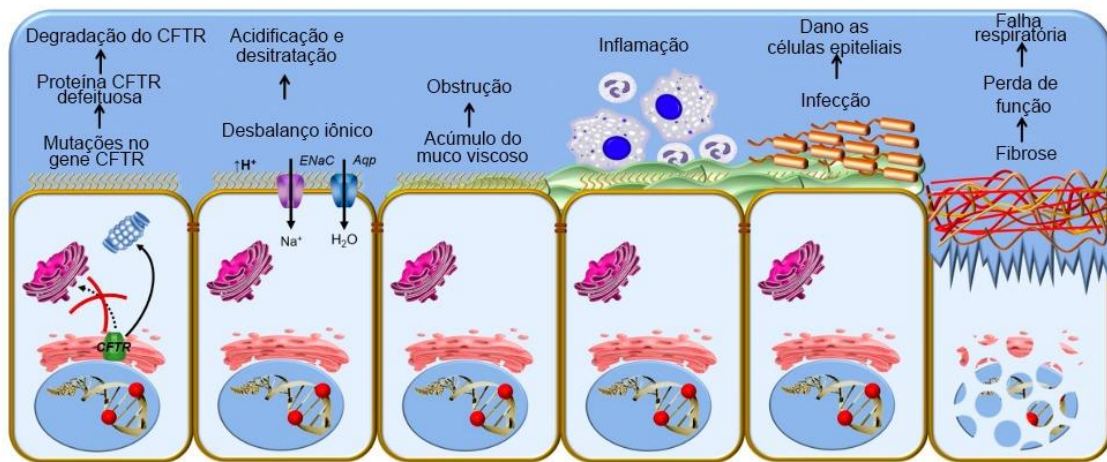


Figura 1.3 – Efeitos decorrentes dos defeitos no canal CFTR. Ciclo de obstrução de vias aéreas, inflamação e infecção levam a danos às células do epitélio pulmonar devido ao canal CFTR defeituoso. Fonte: Adaptado de LOPES-PACHECO, 2016.

A morte prematura se dá porque os brônquios e pulmões são afetados por bronquite crônica e broncopneumonia, geralmente desencadeada por bactérias específicas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. A permanência dessas bactérias é responsável pela infecção e inflamação crônica dos pulmões, com deterioração progressiva e declínio gradual da função respiratória levando a insuficiência do órgão (RATJEN et al., 2015).

## 1.7 Diagnóstico

No Brasil, através da Portaria GM/MS nº 822 de 6 de junho de 2001, criou o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e incluiu o diagnóstico precoce para fibrose cística, através da realização do teste de pezinho (DAMACENO, 2020). No teste é realizada a dosagem do tripsinogênio imunorreativo (IRT) - uma enzima pancreática - em amostra de sangue colhida em até 30 dias de vida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Quando há bloqueio dos dutos pancreáticos, o tripsinogênio não pode ser convertido em tripsina no intestino, elevando sua concentração na corrente sanguínea, o que é detectado pelo teste (SERRANO, 2016). Os valores de referência desse teste consideram como normais valores abaixo de 70 ng/mL em sangue total, em até 30 dias de vida. Após esse período, os níveis do IRT se normalizam, então é recomendado a realização direta do teste do suor (DAMACENO, 2020). O teste do tripsinogênio imunorreativo não é

específico para fibrose cística, todavia, quando os valores apresentam alterações deve ser realizado o teste do suor uma vez que o teste que realiza a dosagem do IRT apresenta altos índices de falsos-positivos (PAGIN; SERMET-GAUDELUS; BURGEL, 2020).

O teste do suor mede a concentração de cloreto, sendo positivo para fibrose cística quando os níveis são maiores que 60 mmol/L em duas amostras independentes analisadas (ATHANAZIO et al., 2017). Ainda que o teste do suor seja o mais utilizado para o diagnóstico, este não informa o tipo de mutação que o portador de fibrose cística possui, informação que ajudaria o médico na prescrição do tratamento mais adequado, visto que já estão disponíveis no mercado potenciadores e corretores do canal CFTR para algumas das mutações existentes (DEKKERS et al., 2013). Atualmente, uma das únicas formas de conhecer as duas mutações do paciente é através do sequenciamento do DNA do gene CFTR (SERRANO, 2016). No Brasil, o exame ainda não está disponível pelo Sistema Único de Saúde, mas o Grupo Brasileiro de Estudos em Fibrose Cística no “Projeto de Genotipagem”, em 2017, fez sequenciamento genético gratuito aos pacientes com FC cadastrados nos Centros de Referência.

## **1.8 Tratamento**

As terapias atuais para fibrose cística são principalmente sintomáticas e com foco na recuperação da função dos pulmões e na normalização da captação de nutrientes para o crescimento físico (LOPES-PACHECO, 2020). Os pacientes com fibrose cística fazem uso de vários medicamentos como antibióticos, anti-inflamatórios, broncodilatadores, mucolíticos, reposição de enzimas digestivas, uso de vitaminas lipossolúveis combinados a procedimentos como fisioterapia respiratória, oxigenoterapia, exercícios físicos e suporte nutricional para manter o funcionamento dos órgãos e minimizar os sintomas (ROSA et al., 2008). O transplante pulmonar é o tratamento estabelecido para pacientes com doença pulmonar terminal (RATJEN et al., 2015) sendo estimado que cerca de 16,4% do total de transplantes de pulmão realizados no mundo são realizados em adultos com fibrose cística (LYNCH et al., 2015). Os resultados para pacientes submetidos a transplante, mostram que os pacientes melhoraram rapidamente, mas são relatadas algumas complicações como falha do enxerto (aguda ou

crônica), infecções oportunistas e complicações com os medicamentos imunossupressores crônicos que fazem que a taxa de sobrevivência seja cerca de 50% no período de 5 anos (LYNCH et al., 2015). Nos últimos anos, surgiram medicamentos que buscam corrigir diretamente os efeitos causados por mutações do gene CFTR e que receberam aprovação regulatória (LOPES-PACHECO, 2020).

O medicamento Ivacaftor (VX-770) é considerado um potenciador, sendo responsável por se ligar diretamente a proteína CFTR aumentando a probabilidade de abertura do canal. Esta foi a primeira terapia guiada aprovada para tratamento da fibrose cística (LOPES-PACHECO, 2016). A droga atua em células que possuem mutações das classes III e IV, em que a proteína CFTR está presente na membrana apical da célula, mas é disfuncional, ou então quando está em pequena quantidade (classe V) (FAJAC; GIRODON, 2020). Já os medicamentos como lumacaftor (VX-809) e tezacaftor são chamados de corretores e são responsáveis por melhorar o processamento intracelular e a quantidade de CFTR presente na membrana plasmática.

Além disso, o medicamento Orkambi (lumacaftor/ivacaftor) atua como um potenciador e corretor, e é um dos medicamentos utilizados para portadores dos dois alelos com a mutação F508del. O medicamento da empresa Vertex já é aprovado nos Estados Unidos, União Europeia e no Brasil (LOPES-PACHECO, 2016). Em pacientes portadores de genótipos específicos de FC, esses medicamentos demonstraram bons resultados de curto e longo prazo, incluindo melhorias na função pulmonar e aumento no índice de massa corporal (LOPES-PACHECO, 2020). A terapia combinada representou uma grande evolução no quadro clínico, embora seja relatado que seu benefício clínico nos homocigotos F508del ainda permanece abaixo das expectativas, sugerindo que alguns defeitos causados pela mutação podem não ser alvos dessas terapias (FROUX et al., 2019) necessitando de um desenvolvimento mais direcionado para estes pacientes.

## 1.9 Custos

Um estudo realizado por Rubin e colaboradores (2017) avaliou os custos para o sistema privado nos Estados Unidos de um portador de fibrose cística, sendo 44,8% dos pacientes homocigotos para F508del, e atribuiu valores anuais entre US\$ 30.000 para pacientes com doença leve até US\$119.000 no caso da doença grave. Além disso, caso fosse necessária intervenção hospitalar devido a episódios agudos relacionados à função pulmonar, os valores poderiam chegar a US\$ 45.361 por internação (RUBIN et al., 2017). Em outro estudo realizado nos Estados Unidos, foram estimados os custos básicos anuais que os portadores de fibrose cística têm com enzimas pancreáticas (US\$600–1.000), broncodilatadores (US\$ 42.000), antibióticos (US\$12.000–34.000) e hospitalizações (\$0–120.000) e os valores foram comparados com o dos medicamentos que atuam como moduladores do canal CFTR que variam de US\$250.000 a 368.000 por ano (ORENSTEIN; ABOOD, 2018).

Rubin et al., (2017) ainda citam que quase um quarto dos pacientes com fibrose cística atrasam ou ignoram os cuidados devido aos elevados custos de tratamento nos Estados Unidos. De maneira semelhante, no Brasil, Pinto e colaboradores (2019) realizaram um estudo descritivo em hospital de referência nacional em doenças raras localizado no estado do Rio de Janeiro e entrevistaram 99 famílias. Os resultados mostraram que para fibrose cística, o custo mediano mensal não médico considerando apenas a rotina de tratamento, foi de R\$ 2.156,56 (R\$ 961,00-R\$7.345,82) e cada internação do paciente custava cerca de R\$300,00 diariamente, em 2017.

O alto custo para tratamento de portadores de doenças raras abre espaço para a necessidade da cura efetiva (PINTO et al., 2019). Embora o desenvolvimento de medicamentos moduladores do CFTR se mostraram eficazes na causas subjacentes da fibrose cística, eles são de alto custo e não fornecem uma cura, sendo necessários durante toda a vida do paciente (COONEY; MCCRAY; SINN, 2018). Desta maneira, a terapia gênica seria uma alternativa que poderia corrigir permanentemente e alterar o fenótipo dos afetados (SCHNEIDER-FUTSCHIK, 2019)

### 1.10 Terapia Gênica

A terapia gênica é baseada na manipulação de genes de um indivíduo para tratar, prevenir ou curar uma doença (HODGES; CONLON, 2019) e pode ser aplicada em doenças raras, uma vez que a maior parte dessas doenças têm origem genética (WHITE, 2019). As terapias existentes são projetadas para: inserção de uma cópia normal do gene mutado, a inativação de um gene que funciona incorretamente via RNA de interferência (iRNA), ou então, a correção do gene mutado via edição de genoma (ANGUELA; HIGH, 2019). Recentemente surgiu a possibilidade de corrigir os defeitos diretamente no DNA com técnicas de edição que utilizam tipos diferentes de nucleases (ZINC-FINGER, TALEN ou CRISPR/Cas9) que são específicas para certas sequências de DNA. Estas nucleases introduzem quebras na fita dupla próximas ao local da mutação a ser corrigida e depois dependem de uma sequência de reparo doada e dos mecanismos celulares de reparo do DNA para reconstituir ou corrigir o funcionamento do gene alvo (HODGES; CONLON, 2019).

O uso clínico da terapia gênica ainda possui alguns desafios: eficiência da transfecção, o direcionamento específico para as células-alvo, mutações inespecíficas (*off-targets*), a duração da expressão e a segurança do método empregado (SILVA; BARBOSA JÚNIOR, 2018). Uma das principais preocupações quando se fala em terapia gênica é a segurança, principalmente quando são utilizados vetores virais para a entrega do transgene (GRIESENBACH; PYTEL; ALTON, 2015). Cerca de 70% dos testes clínicos de terapia genética realizados usaram vírus modificados (retrovírus, lentivírus ou adenovírus) para entrega do material genético, porém estes vetores virais integrantes apresentam o risco de mutagênese insercional, que ocorre quando o DNA viral é inserido em genes, interrompendo sua expressão ou ativando um oncogene (SCHNEIDER-FUTSCHIK, 2019). Assim, o uso de vetores não virais têm ganhado muita atenção pela questão de biossegurança, já que apresentam menor imunotoxicidade e menos risco de integração ao genoma (RAMAMOORTHY; NARVEKAR, 2015).

A aplicação eficaz da terapia gênica para fibrose cística ainda é um desafio, principalmente devido à entrega e a expressão genética transitória (GUAN et al., 2019). O desenvolvimento clínico da terapia gênica pulmonar é



mais lento que outros órgãos-alvo, devido à presença majoritária de células diferenciadas que são lentamente substituídas pelas progenitoras e as barreiras extracelulares (muco, liberação mucociliar e mecanismo de resposta imune efetivas) que prejudica a transferência gênica para esse órgão via inalação (HODGES; CONLON, 2019). Todos esses fatores fazem com que a entrega seja um desafio sem o uso de vetores virais, além disso é relatado uma certa complexidade na regulação do CFTR, a nível celular no pulmão, na medida em que os vários tipos de células residentes teriam um nível de expressão diferente (HAN et al., 2015).

Um conjunto de evidências sugere que mesmo quantidades baixas de expressão de CFTR podem ser suficientes para melhorar o quadro associado a doença pulmonar. Cerca de 25% das células que expressam CFTR são necessárias para permitir o transporte eficiente (I et al., 2012), embora existam experimentos que mostraram cerca de 6 a 10% das células expressando CFTR, já seriam o suficiente para a recuperação (ROGERS et al., 2008). Uma das principais limitações em se determinar a eficiência deste tipo de terapia está na quantificação do CFTR, uma vez que a quantificação da expressão do CFTR se dá pela avaliação do mRNA ou então da detecção da proteína. A detecção do mRNA é realizada pela técnica de RT-qPCR. Já a detecção da proteína é realizada por western blot, uma técnica não funciona bem nas biópsias obtidas dos tecidos de pacientes com FC, visto a baixa expressão do CFTR nos tecidos (GRIESENBACH; PYTEL; ALTON, 2015). Como agravante, nenhum dos estudos clínicos já realizados demonstrou evidências de correção do defeito de transporte do canal, sendo avaliada a eficiência apenas em técnicas moleculares e avaliação clínica.

Alguns estudos clínicos foram realizados aplicando terapia gênica para fibrose cística, por exemplo: o estudo NCT00004471 de fase I com 9 participantes da Universidade do Alabama em Birmingham (2011) buscou determinar se cópias do gene da fibrose cística poderiam ser entregues às células que revestem o nariz de pacientes com fibrose cística usando transferência gênica mediada por lipossomo catiônico (DMRIE / DOPE), porém não há resultados publicados até o momento. Um dos maiores ensaios clínicos para fibrose cística, NCT01621867 de Fase II com 130 participantes, foi realizado

pelo *Consórcio UK Cystic Fibrosis Gene Therapy* (UK CFGTC) realizou a entrega de DNA em forma de plasmídeo que codifica o gene CFTR complexado com um lipossomo catiônico, a administração era realizada pela nebulização de 5 mL do complexo pGM169/ GL67A-lipossoma ou solução salina a 0,9% (placebo) mensalmente durante 1 ano. Os resultados obtidos mostraram que essa abordagem apresentou apenas um efeito estabilizador médio, registrada apenas em alguns indivíduos e que resultaram em alterações nos cuidados relacionados ao paciente, porém não foram suficientes para melhorar a doença pulmonar. Além disso, não foram apresentadas evidências moleculares da expressão do transgene CFTR e os estudos não passaram para Fase III (ALTON et al., 2015).

No que diz respeito à terapia celular, o estudo NCT02866721 de 2016, utiliza células-tronco mesenquimais alogênicas, via infusão intravenosa, em pacientes com fibrose cística. O estudo foi realizado com 14 pacientes e o objetivo é avaliar segurança e tolerância da terapia para futuras aplicações clínicas. O estudo foi finalizado em dezembro de 2020, no entanto ainda não há resultados publicados. Os resultados obtidos serão pioneiros quanto a este tipo de terapia em fibrose cística.

Em se tratando da técnica de CRISPR, ainda não há estudos clínicos aplicando a tecnologia para a fibrose cística, todavia existem ensaios clínicos em andamento para doenças genéticas, HIV e câncer. O estudo clínico (NCT03872479) utiliza a técnica para excluir uma mutação no gene CEP290, responsável pela doença rara amaurose congênita de Leber 10 (LCA10), que causa disfunções na retina levando à cegueira na infância (MAEDER et al., 2019). Para corrigir a mutação IVS26, o produto em desenvolvimento (EDIT-101) usa uma construção contendo o vetor de adenovírus AAV5 com dois RNAs guia para identificar a localização da mutação IVS26 no gene CEP290, combinado com DNA que codifica a enzima Cas9 sob um promotor específico para células fotorreceptoras (HARRISON, 2020). O estudo está em andamento.

Em 2020, foi iniciado o estudo clínico NCT04601051 de fase 1, da empresa *Intellia Therapeutics*, utiliza o sistema CRISPR como forma de tratar a doença transtirretina amiloidose (ATTR). A doença é causada por mutações no gene TTR, que faz com que o fígado produza uma proteína chamada transtirretina (TTR) em uma forma mal dobrada que se acumula no corpo

causando insuficiência cardíaca e neuropatias. Com o objetivo de corrigir a mutação, o estudo utiliza nanopartículas lipídicas para a entrega, administrado por via venosa, do RNA guia específico para o gene TTR e o RNA mensageiro que codifica a proteína Cas9 (INTELLIA, 2020). O estudo está em andamento e não há resultados publicados.

### **1.11 Custos da Terapia Gênica**

Segundo uma estimativa, um medicamento aprovado para terapia genética custa quase US\$ 5 bilhões, cerca de cinco vezes mais alto que o custo médio da aprovação do *Food and Drugs Administration* (FDA) para um medicamento comum. De um modo geral os custos para aplicação de uma terapia gênica segura e eficaz ainda é muito alto, por exemplo o produto Glybera fabricado pela empresa UniQure, aprovado para uso em 2012 na Europa, é baseado em um vetor adenoassociado não-replicativo, destinado a pacientes com deficiência de lipoproteína lipase (SILVA; BARBOSA JÚNIOR, 2018) e custa cerca de US\$ 1 milhão por paciente, ainda que restem dúvidas quanto à sua eficácia (ORKIN; REILLY, 2016).

No Brasil, a regulamentação frente ao uso de produtos relacionados a terapia celular avançada e terapia gênica segue a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 260/2018 e foi um marco regulatório para o tema. A resolução surgiu como uma complementação para a RDC 214/2018 que dispõe sobre boas práticas na utilização de células humanas para uso terapêutico e em pesquisa clínica. Em 2020 foi aprovada a RDC 338/2020 estabelecendo os requisitos mínimos para o registro de produto de terapia avançada para comprovar eficácia, segurança e qualidade, permitindo a comercialização no Brasil (ANVISA, 2020). Com essas novas medidas regulatórias a quantidade de ensaios clínicos e pesquisas aplicadas a terapia gênica tendem a aumentar no Brasil.

Atualmente, existem dois produtos de terapia gênica aprovados para uso no Brasil: o Luxturna e o Zolgensma, ambos utilizam a transferência do material genético via o vetor adenovírus associado (BULAKLAK; GERSBACH, 2020). O medicamento Luxturna, da empresa Spark Therapeutics, é usado para

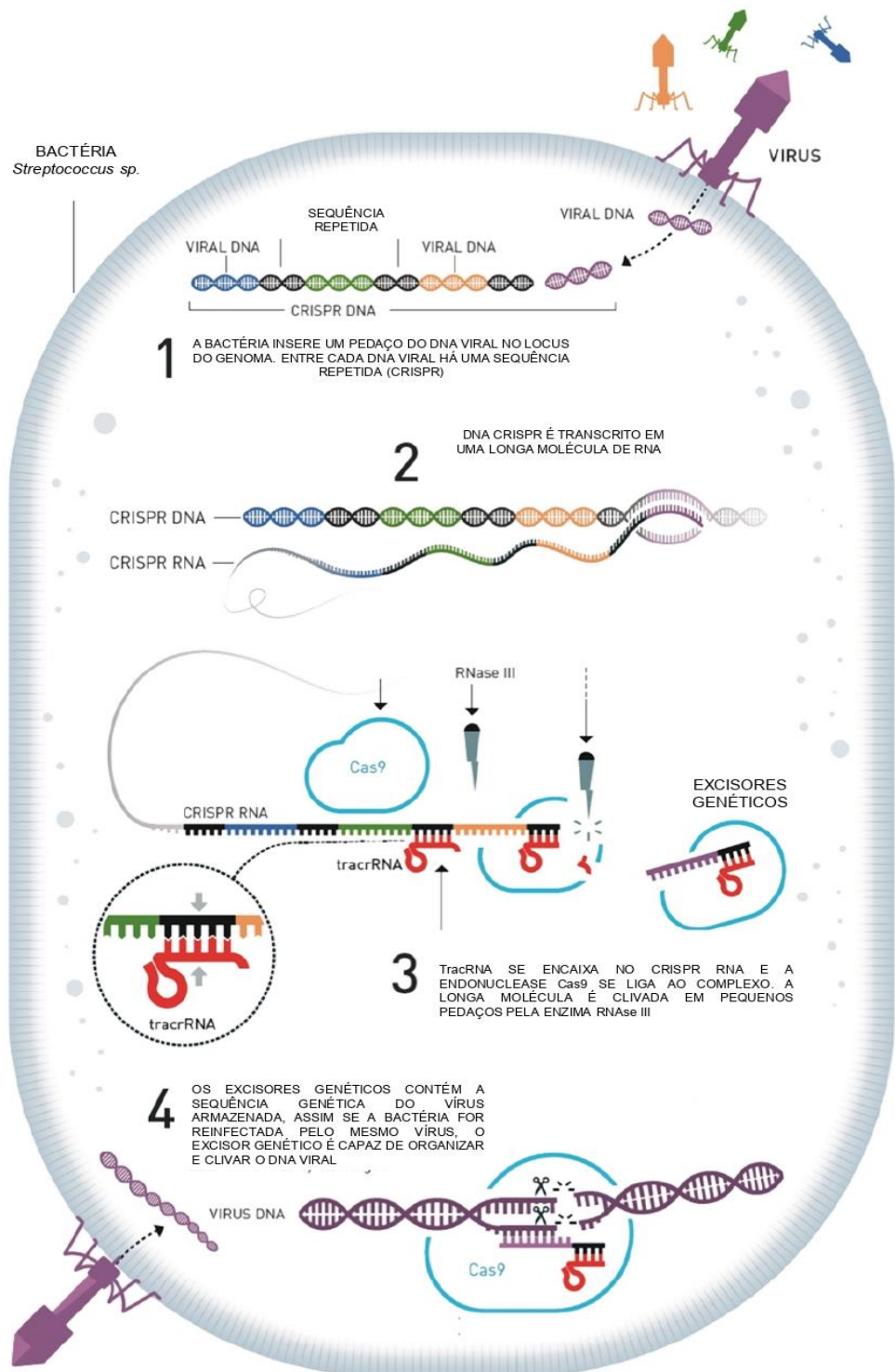
tratar a doença amaurose congênita de Leber que afeta a retina, o tratamento insere, no espaço sub-retiniano, uma cópia funcional do gene RPE65 às células epiteliais pigmentares da retina (RPE), restaurando a capacidade das células de produzir a enzima principal. O custo médio é estimado entre US\$ 1 milhão e US\$ 2 milhões de dólares (WALTZ, 2018). O medicamento produzido pela empresa Novartis, Zolgensma, é usado no tratamento da atrofia muscular espinhal (AME), uma doença neuromuscular degenerativa e progressiva, e foi liberado em novembro de 2020 pela Agência reguladora brasileira (ANVISA) permitindo a comercialização no Brasil. A autorização foi dada em caráter excepcional pois são necessários a realização de estudos adicionais para comprovar a eficácia. A doença, monogênica, é causada pela mutação na proteína necessária para formação dos neurônios ligados ao movimento dos músculos, levando a atrofia progressiva dos músculos e a morte precoce. O custo, por paciente, fica em torno de US\$ 2 milhões (VALÉCIO, 2020).

### **1.12 Ferramentas de Edição Gênica na Fibrose Cística**

Tendo em vista as possibilidades terapêuticas da terapia gênica aplicada a fibrose cística e a problemática de inserir o gene CFTR inteiro nas células-alvo, várias ferramentas de edição do genoma vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de corrigir as mutações existentes no gene e restaurar a função do canal melhorando a qualidade de vida dos portadores da doença (FAJAC; GIRODON, 2020). Vários estudos *in vitro* foram realizados a fim de se mostrar a eficiência na edição genética aplicada a fibrose cística com o uso das ferramentas como as nucleases dedo de zinco, TALEN e CRISPR/Cas9.

A ferramenta de edição do DNA conhecida como CRISPR/Cas9 foi desenvolvida com base em um dos mecanismos de defesa de bactérias e *archaeas* quando estas são infectadas por ácidos nucleicos virais (LIU et al., 2017). A nomenclatura CRISPR vem do acrônimo (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) e se refere às sequências curtas de DNA do material genético viral (protoespaçadores) que se integram no DNA bacteriano próximas a outras sequências que são repetidas, palindrômicas, curtas e intercaladas (CRISPR) (WANG; LA RUSSA; QI, 2016). Assim quando uma bactéria é novamente atacada pelo mesmo DNA viral, esses espaçadores

são transcritos da matriz e usados para guiar um complexo proteico (proteínas Cas9) capazes de clivar esses protoespaçadores em moléculas de ácido nucleico viral em uma segunda infecção. Para evitar autoimunidade, algumas bactérias têm sistemas CRISPR/Cas9 que clivam alvos de DNA somente se estiverem próximos de sequências conhecidas como motivos adjacentes ao protoespaçador (PAMs). A Figura 1.4 ilustra como ocorre essa integração.



©Johan Järnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences

Figura 1.4- Funcionamento do sistema CRISPR em bactérias. Mecanismo pelo qual bactérias invadidas por vírus selecionam sequências curtas do DNA viral (protoespaçador) e integram essas entre regiões específicas em seu próprio genoma (CRISPR), de forma quando houver uma segunda infecção esse locus é transcrito guiando um complexo de clivagem com proteínas Cas9 que clivam este DNA viral impedindo uma nova infecção. Fonte: Adaptado de Johan

Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences (2021). Disponível em:<<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/popular-information/>>. Acesso em: 20 mar 2021

Baseado neste mecanismo de defesa bacteriano, foi desenvolvido o sistema de edição genômica denominado CRISPR que pode ser aplicado na edição de genomas, inserção e deleção de sequências de DNA (YOSEF; QIMRON, 2015). A ferramenta CRISPR é baseada na entrega de dois componentes principais: um RNA que serve como guia reconhecendo uma sequência de nucleotídeos específica no genoma e uma proteína que é capaz de clivar a uma sequência específica de nucleotídeos denominada sítio PAM e clivar a dupla-fita de DNA de modo que essa quebra na dupla-fita ativa o mecanismo de reparo da própria célula (WHITE, 2019). A proteína Cas9 é uma endonuclease que realizará a clivagem do DNA e pode ser derivada de diferentes bactérias como (SaCas9) de *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) por exemplo. O RNA que serve como guia (sgRNA) é formado por duas partes: a parte constante que serve como arcabouço para a ligação da proteína Cas9 denominado *tracrRNA* e a parte variável construída especificamente para o alvo no DNA (CUI et al., 2018). Para que exista a clivagem da dupla fita do DNA é necessário que a sequência de DNA (*protospacer*) seja complementar a sequência do sgRNA e adjacente ao sítio PAM para que a Cas9 reconheça e clive (REDMAN et al., 2016). Como o DNA desempenha uma função essencial na manutenção celular, os mecanismos de reparo são regulados durante o ciclo celular pelos pontos de verificação (*checkpoints*) que garantem que o DNA de uma célula esteja intacto antes de permitir a replicação e a divisão celular (BRANZEI; FOIANI, 2008).

Desta forma, uma vez que a Cas9 realize a quebra na dupla-fita do DNA (DSB), estas podem ser reparadas por dois mecanismos distintos pela própria célula sendo a junção das extremidades não homólogas NHEJ (*Non-homologous end joining*) e o reparo dirigido por homologia HDR (*Homology directed repair*) (CUI et al., 2018). No tipo de reparo NHEJ as extremidades da quebra são simplesmente justapostas e religadas com a perda de nucleotídeos no sítio da ligação (ALBERTS et al., 2012). Embora esse tipo de reparo cause inserções e deleções no genoma, este tipo tem maior frequência na espécie

humana. O reparo NHEJ depende do heterodímero Ku (Ku70 e Ku80) que é o primeiro complexo que reconhece e se liga nas regiões da quebra de dupla fita e serve como um arcabouço para recrutar outras proteínas que auxiliam no mecanismo de reparo (BRANZEI; FOIANI, 2008). Dentre esses, a enzima DNA ligase IV usa pedaços pendentes de DNA adjacentes para unir e preencher as extremidades, realizando o reparo. O outro tipo de reparo, HDR, ocorre durante e logo após a replicação de DNA (nas fases S e G2), quando as cromátides irmãs estão fisicamente muito próximas, precisando assim um doador de homologia (LIN et al., 2014). Dessa forma, quando a célula não está nas fases S ou G2 o mecanismo NHEJ é utilizado.

Para que ocorra o HDR, o DNA precisa ter algumas regiões de homologia reconhecidas através do pareamento de bases (ALBERTS et al., 2012). Na primeira etapa, as extremidades do DNA danificado são removidas, produzindo uma extremidade de fita simples 3' e a proteína de replicação A (RPA) primeiro reveste e estabiliza esse DNA fita simples gerado recentemente e ativam proteínas de resposta a danos ao DNA (p53, BRCA1 e CHK2) subsequentemente podem ser ativadas diferentes vias de HDR que podem ser dependentes ou independentes de RAD51 (YEH; RICHARDSON; CORN, 2019). Uma vez reconhecida a sequência homóloga por pareamento de bases, uma enzima DNA-polimerase de alta fidelidade alonga a fita danificada usando a informação fornecida pelo DNA-molde, presente na cromátide-irmã ou DNA doador, realizando a correção. As etapas finais incluem deslocamento da fita, síntese adicional do reparo e ligação que finaliza a regeneração das duplas hélices. A Figura 1.5 mostra os elementos necessários para aplicação da tecnologia CRISPR/Cas9.



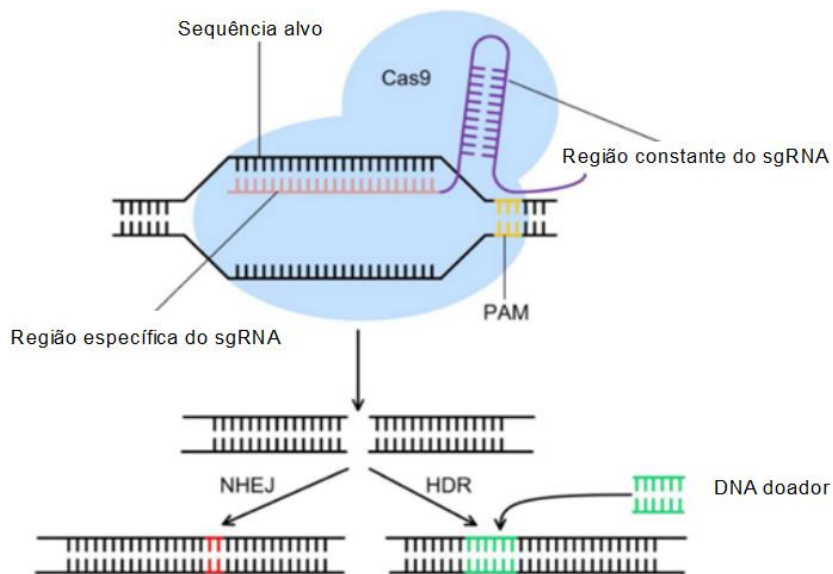


Figura 1.5- Componentes e mecanismo básico necessário para aplicação do CRISPR. A edição de genomas é baseada em uma molécula de sgRNA e de uma proteína Cas9 que ao produzir quebra na dupla fita de DNA ativa o mecanismo de reparo de DNA da célula (NHEJ ou HDR).  
 Fonte: Adaptado de CUI et al., 2018

Além dos dois tipos de mecanismos de reparo, existe o reparo dirigido por micro homologia (MMEJ) que de maneira semelhante ao NHEJ, une as extremidades quebradas do DSB sem a necessidade de um DNA molde. No entanto, o MMEJ requer a ressecção final produzindo uma fita simples contendo uma hidroxila livre no terminal 3' de maneira semelhante ao HDR, mas este tipo de reparo causa grandes deleções no DNA, sendo mais aplicado em silenciamento de genes (YEH; RICHARDSON; CORN, 2019).

O maior desafio na aplicação do CRISPR é o método de entrega do complexo de maneira eficiente (LIU et al., 2017). São descritos métodos, sendo estes físicos (microinjeção, eletroporação, biobalística, injeção hidrodinâmica), métodos químicos (mediadores lipídicos, nanopartículas poliméricas, nanopartículas de ouro, peptídeo sinal, iTOP) e virais (lentivírus e adenovírus associados) todos com suas vantagens e desvantagens (LINO et al., 2018; LIU et al., 2017). No geral, a eficiência de edição baseada em CRISPR ainda permanece muito baixa, com menos de 10% de células editadas (LINO et al., 2018). Embora o sgRNA seja desenhado especificamente para a região do DNA em que se deseja editar, existe a possibilidade do complexo parear em outras regiões parecidas e gerar mutações fora do alvo (*off-targets*) que podem ocorrer

no genoma com até três nucleotídeos incompatíveis na região distal do PAM do alvo (CUI et al., 2018). Para tentar mapear e verificar a existência dos *off-targets*, foram desenvolvidas diferentes metodologias: predição *in silico* por ferramentas de bioinformática, ensaio com a enzima endonuclease T7 e o sequenciamento do DNA. De maneira geral, a predição *in silico* utiliza softwares que comparam a sequência do sgRNA desenhado com os possíveis alvos no genoma, para até 4 *mismatches* (pareamentos imperfeitos). Já o ensaio com a enzima endonuclease T7 detecta eventos de inserções e deleções (*indels*), visto que a enzima cliva o DNA quando ocorre o pareamento imperfeito de bases. O produto da reação é aplicado em gel de agarose e com o perfil de migração destes fragmentos pode-se inferir a quantidade *off-targets*, mas também com baixa sensibilidade, uma vez que não é possível saber o local do *off-target* no genoma e que tipo de mutação foi gerada. Por fim, pode ser realizado sequenciamento das regiões preditas *in silico* ou sequenciamento em larga escala e a comparação com a sequência genômica (HAN et al., 2015).

A aplicação da tecnologia de CRISPR na cura de doenças representa uma área muito promissora na biotecnologia, embora ainda existam poucos ensaios clínicos aplicados a fibrose cística, alguns documentos de patentes foram encontrados, nas bases de dados WIPO (World Intellectual Property Organization) - Patent Scope, sobre como melhorar e aplicar essa tecnologia.

O documento de patente WO2015052133A1 - *Permanent gene correction by means nucleotide-modified messenger RNA* de 2015 descreve modificações químicas realizadas no mRNA e a entrega via vetor viral para o tratamento de doenças pulmonares: fibrose cística (FC), asma ou doença pulmonar obstrutiva crônica. Já no documento de patente EP3079725A1- *Delivery, use and therapeutic applications of the CRISPR/ Cas systems and compositions for genome editing* do Broad Institute de 2014 são citadas diferentes modificações que podem ser realizadas no sgRNA e na proteína Cas9 além de diferentes construções de ferramentas moleculares a fim de melhorar o direcionamento para aplicação terapêutica. O documento também descreve como melhorar a entrega dos componentes via vetores virais, podendo ser aplicado a fibrose cística, embora não há nada específico para este fim. O documento de patente específico para fibrose cística, depositado nos Estado Unidos e Europa, é o

US20170022507 - CRISPR/Cas-related methods and compositions for treating cystic fibrosis da empresa Editas Medicine. Nele é descrito o processo de aplicação da tecnologia de edição em fibrose cística, consistindo nos desenhos e estrutura de sgRNAs para algumas mutações no gene CFTR (F508del, G542X, c.3849+10 kb), modificações químicas, uso de nucleases Cas9 de diferentes bactérias, modificação química das nucleases, sequências e tamanhos de diferentes braços de homologia que serão usados como DNA doador e aplicação em células das vias aéreas, epiteliais e células-tronco.

No Brasil, os documentos de patente são depositados na base de dados do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI). Acerca da temática de edição genética aplicado a fibrose cística, ainda não há documentos na base de dados. Ao se falar sobre estratégias sobre terapia gênica, o documento BR 112018073671-6 (THOMAS et al., 2019) aborda estratégias de entrega de RNA, utilizando nanopartículas, de forma a recuperar a função de proteínas, incluindo o canal CFTR. Outros documentos publicados envolvem o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico e formulações farmacêuticas.

### **1.13 Justificativa**

A fibrose cística é uma doença genética, monogênica e com a principal mutação (F508del) já conhecida. A doença não tem cura e a qualidade de vida dos pacientes é bem comprometida, sendo a falha pulmonar a causa principal de morte pela doença. Neste contexto, cabe mencionar a necessidade de desenvolver novas terapias para o tratamento eficaz da doença, uma vez que a doença afeta 1 a cada 10 mil pessoas no Brasil, não há cura disponível e os medicamentos existentes são de alto custo.

Desta maneira, com os avanços científicos e a possibilidade de editar o DNA, surge a possibilidade de estabelecer metodologias visando a aplicação da terapia gênica e celular para fibrose cística. Portanto, a fim de contribuir para o desenvolvimento deste tipo de terapia é necessário realizar a construção de ferramentas moleculares, baseadas em CRISPR/Cas9, para verificar a eficiência da edição *in vitro* e outros aspectos envolvendo a aplicação da técnica neste modelo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Construir ferramentas moleculares para aplicação da técnica de CRISPR/Cas9 para corrigir a mutação F508del causadora de fibrose cística no modelo de célula de epitélio pulmonar (CFBE).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- (1) Construir ferramentas de edição baseada em plasmídeo e ribonucleoproteína;
- (2) Estabelecer o método de transfecção, no modelo do plasmídeo;
- (3) Estabelecer a concentração de drogas que atuam sincronizando o ciclo celular;
- (4) Estabelecer metodologias para avaliar a correção da mutação F508del
- (5) Avaliar a correção com uso das ferramentas construídas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 CONSTRUÇÃO DE FERRAMENTAS

##### 3.1.1 Desenho do sgRNA e Mapeamento dos *off-targets*

A sequência do gene CFTR (NG\_016465.4) e do RNA mensageiro – mRNA (NM\_000492.3) foi obtida na base de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a partir da sequência do genoma humano (GRCh38.p12). Com o software SnapGene (GSL Biotech) a sequência codificante (CDS) do gene CFTR foi identificada e o aminoácido 508 (sequência de nucleotídeos CTT) localizado, conforme exemplificado na Figura 3.1. Uma região de 200 pares de bases antes e depois da posição 508, totalizando 400 pares de base, foi selecionada para a predição dos desenhos do RNA guia (sgRNA). Para o desenho dos sgRNAs, que atuarão no reconhecimento da região do gene CFTR a ser clivada pela proteína Cas9, foram utilizadas duas ferramentas online já descritas literatura ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) (LABUN et al. 2019) e Eukaryotic Pathogen CRISPR gRNA Design Tool (<http://grna.ctegd.uga.edu/>) (PENG et al., 2015).

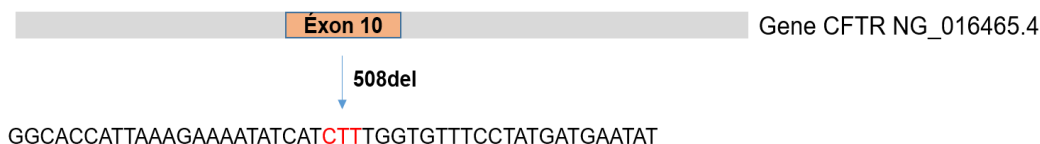


Figura 3.1 - Localização da mutação F508del no gene CFTR.

Com a sequência do gene, os 400 pares de bases na região da posição 508 foi inserida nos softwares, assim como os sítios PAM das proteínas SaCas9 (NNGRRT) e SpCas9 (NGG) em que N representa qualquer nucleotídeo e R representa A ou G, além disso foi definido um número máximo de 3 *mismatches*. A escolha de cada sequência foi realizada com base na: (1) proximidade do sgRNA com a o local da mutação F508del; (2) eficiência predita informada pelo software e (3) quantidade e localização de possíveis *off-targets* no genoma humano. Analisando estes parâmetros foram selecionados 3 sgRNAs para cada uma das proteínas de clivagem (SaCas9 e SpCas9), totalizando 6 sgRNAs a serem testados.

O mapeamento dos *off-targets* e seus locais preditos foram analisados com o auxílio de softwares online, sendo CasOffinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>) (BAE; PARK; KIM, 2014) utilizada para prever a quantidade de *off-targets* totais e a posição destes no genoma humano. Para determinar o local em que o possível *off-target* afetará no genoma, a proximidade deste no sítio PAM e a região do genoma a ser sequenciada para confirmar foi utilizado o software CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) (CONCORDET; HAEUSSLER, 2018) selecionando 3 *mismatches*, embora seqüências contendo 4 *mismatches* em éxons também foram consideradas na análise. O software também permitiu confirmar os desenhos dos sgRNA e sua eficiência teórica. Com base nos resultados obtidos, optou-se por selecionar as seqüências que reconheceriam o menor número de éxons possível.

### 3.1.2 Construção do sgRNA no plasmídeo px458

O plasmídeo px458 (addgene 152199) foi modificado de forma a expressar o gene repórter da proteína vermelha fluorescente (RFP). Este plasmídeo permite a expressão do sgRNA, através de sítios de clonagem, e da proteína SpCas9, além do gene repórter (RFP). Para construção desta ferramenta, foi seguido o protocolo de Cong e colaboradores (2013). Inicialmente, duas seqüências de oligonucleotídeos complementares, contendo a seqüência dos sgRNA, foram sintetizados pelo método de dessalinização.

Como a enzima BbsI apresenta dois sítios de restrição no plasmídeo px458, sendo que a região de corte desta enzima forma um *overhang* 3' no qual os oligonucleotídeos devem parear (GTTTTTA e GTTT), os sgRNAs foram desenhados com as seqüências complementares a estes sítios, conforme apresentado na Figura 3.2.



Figura 3.2 Seqüência dos sgRNAs com o sítio da enzima BbsI. Fonte: (CONG et al., 2013)

A ligação do sgRNA no plasmídeo ocorreu em cinco etapas que compreendem: (1) abertura do plasmídeo, (2) fosforilação e anelamento dos

oligonucleotídeos, (3) ligação dos oligonucleotídeos no plasmídeo, (4) transformação da bactéria e (5) confirmação dos clones. Segue a descrição detalhada de cada etapa:

(1) Abertura do plasmídeo: 2µg do plasmídeo px458 foi digerido com 1µL da enzima BbsI (New England Biolabs, Massachusetts, USA) em um volume de reação de 40µL durante 16 horas a 37°C. Em seguida, para separação do fragmento, a amostra foi adicionada a glicerol 5x e submetida a um gel de agarose 0,8% submerso em tampão TAE (Tris, acetato, EDTA). Após a migração do DNA no gel, o mesmo foi incubado em *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, USA) durante 20 minutos e a banda foi visualizada em luz UV no fotodocumentador de gel de agarose LPIX (Loccus Biotecnologia, USA). A banda correspondente ao plasmídeo aberto foi cortada do gel de agarose e purificada com uso do kit comercial *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits* (GE Healthcare, USA).

(2) Anelamento e fosforilação dos oligos: os oligos sintetizados complementares que compõe o sgRNA (100µM de cada) foram anelados e fosforilados com 1µL da enzima T4 PNK (New England Biolabs, Massachusetts, USA) em um volume de reação de 10µL. O programa iniciado em 95°C seguido de uma rampa de temperatura 5°C decrescente até 25°C usando o termociclador ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA). Em seguida, o produto da reação foi diluído na proporção 1:250 para a reação de ligação no plasmídeo aberto.

(3) Reação de ligação: a reação de ligação foi realizada com 50 ng do plasmídeo px458 aberto, 1µL dos oligos anelados e fosforilados na diluição 1:250 e 1µL da enzima T4 ligase (New England Biolabs, Massachusetts, USA) em um volume de 10µL de reação durante 16 horas a 4°C.

(4) Transformação: A bactéria utilizada foi a cepa de *E. coli* termo-competente (DH5α) e a transformação se deu utilizando 50 µL de bactérias e 3µL da reação de ligação da etapa anterior. A transformação foi realizada por choque térmico incubando as bactérias e o produto de ligação no gelo durante 30 minutos, seguido de 42°C por 40 segundos e retornando ao gelo por 2 minutos. Em seguida, para a recuperação das bactérias foi adicionado 1 mL de

meio de cultura Luria Bertani (LB) e incubação a 37°C durante 1 hora. Em placas contendo LB com ampicilina, foram colocados 250µL por placa e o crescimento das colônias ocorreu a 37°C por 16 horas.

(5) Confirmação dos clones positivos: Foram utilizadas três técnicas para confirmar se os clones positivos têm a sequência do sgRNA desejada:

- PCR

Para determinar se as colônias que cresceram na placa possuem as sequências dos sgRNAs, estas foram submetidas a uma PCR de colônia utilizando duas combinações de *primers* específicos: (1) *primer forward* do guia específico e *primer* reverso CMVR (CCGTAAATACTCCACCCATTGA) e (2) *primer* U6 *forward* (GAGGGCCTATTTCCCATGATT) e *primer* reverso do guia específico. A colônia de interesse foi adicionada diretamente a reação contendo a Mistura para PCR kit NAV (IBMP) que contém a enzima Taq polimerase e todos os elementos necessários para amplificação no termociclador ProFlex PCR System (ThermoFischer Scientific, USA), com o seguinte programa: 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e por fim 72°C por 5 minutos. As amostras foram submetidas a corrida em gel de agarose 2%, conforme descrito anteriormente. As colônias que apresentaram amplificação por ambas as reações foram selecionadas e incubadas em 5 mL de meio LB contendo ampicilina e cultivadas por 16 h a 37°C sob agitação para expansão das bactérias com os plasmídeos. As células obtidas foram centrifugadas a 12.000 x g por 1 minuto e o sedimento obtido foi utilizado para a extração dos plasmídeos através do kit—QIAprep spin miniprepII (QIAGEN, Hilden, Germany) conforme protocolo do fabricante. Após a purificação dos plasmídeos, sua concentração foi medida por espectrofotometria e foi realizada uma nova PCR com as condições anteriores mencionadas e usando o plasmídeo px458 como controle.

- Corte com Enzimas de restrição

Para confirmar se a sequência foi inserida no plasmídeo, foi realizado corte com as enzimas de restrição BbsI (New England Biolabs, Massachusetts, USA) e SacII (New England Biolabs, Massachusetts USA) usando 500 ng de plasmídeo em um volume de reação de 20µL, sendo a reação a 37°C durante 4 horas com



o tampão específico da enzima. As amostras foram misturadas com glicerol 5x e separadas em gel de agarose 1% conforme descrito anteriormente.

- Sequenciamento das amostras

As amostras foram preparadas para o sequenciamento na Plataforma de Sequenciamento da Fiocruz-RJ pelo método de Sanger com o *primer* U6 (GAGGGCCTATTTCCCATGATT) e CMVR (CCGTAAATACTCCACCCATTGA) e 200ng de DNA do plasmídeo.

### **3.1.3 Padronização do Método de Transfecção para o plasmídeo**

#### **3.1.3.1 Cultura de células**

As células de linhagem oriundas de epitélio pulmonar de paciente com fibrose cística com a mutação F508del (CFBE) e CFBE *wild type* (wt) foram cedidas pelo Dr. Miqueias Lopes Pacheco da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As células foram descongeladas e mantidas em garrafa de 25 cm<sup>2</sup> (Jet Biofil®, China) revestida com matriz de colágeno tipo 1 em meio de cultura *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco™, Invitrogen, EUA) suplementado com 20% de soro bovino fetal (SFB) (Gibco™, Invitrogen, USA) 1% L-glutamina (2mM) (Gibco™, Invitrogen, Califórnia, USA) e os antibióticos 0,1 mg/mL de estreptomicina e 100UI/mL de penicilina (Sigma Aldrich, EUA) em estufa a 35°C, 5% CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific, USA). Após atingir a confluência de 90% da área da garrafa as células foram lavadas com solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio (BSS-CMF) e removidas da garrafa com uso de 0,25% de tripsina (Sigma Aldrich, USA) e 0,02% de ácido etileno-diamino tetra-acético (EDTA) (Merck, USA) durante 5 minutos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após essa etapa, a ação da tripsina foi bloqueada com uso de mesmo volume de meio DMEM suplementado com SFB. As células em suspensão foram homogeneizadas e dessas foi retirada uma alíquota de 10µL de células, adicionando o mesmo volume da solução 0,4% do corante azul de tripano (Sigma Aldrich, USA) e as células foram contadas com auxílio da câmara de Neubauer em microscópio de luz invertido e a viabilidade celular determinada. Após a primeira passagem depois do descongelamento, a matriz de colágeno tipo 1 não foi mais necessária e as células foram mantidas em garrafas de cultivo (Jet Biofil®, China).

Para a transfecção do plasmídeo px458 que possui a sequência do sgRNA, SpCas9 e Gene da proteína fluorescente vermelha (RFP) nas células foram testadas duas metodologias: uma baseada em agentes físicos (eletroporação) e outra baseada em agentes químicos (Lipofectamina).

### 3.1.3.2 Transfecção por Lipofectamina

As células CFBE (F508del) foram plaqueadas em aproximadamente  $1 \times 10^4$  células por poço em placa de 96 poços (Jet Biofil®, China) em uma confluência de aproximadamente 80% contendo 100µL de meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino e 1% de L-glutamina. Foram testadas as concentrações (0,15 µL/poço e 0,30µL/poço) de Lipofectamina 3000 (Invitrogen, USA) e três concentrações (1µg/mL; 2µg/mL e 4µg/mL) de plasmídeo px458 e 2µL de P300 para cada µg de DNA. A transfecção foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante com o meio OPTIMEM (Invitrogen, USA). Após 48 horas as células foram fixadas com para-formaldeído 4% (PFA) durante 10 minutos e os núcleos marcados com o corante DAPI. Para análise da porcentagem de células transfectadas foram adquiridas 25 fotos por poço na objetiva de 20X por meio do sistema de *high content imaging* Operetta CLS” (Perkin Elmer). As imagens foram analisadas de acordo com as seguintes condições: os núcleos foram evidenciados com a coloração de DAPI, com tempo de aquisição de 10 ms, potência de 40% e altura de -4 µm para autofoco em excitação de transmissão e emissão em 655-760nm. As células que receberam o plasmídeo foram evidenciadas no canal RFP (excitação em 488 nm a 532 e emissão em 555 a 584 nm), com tempo de aquisição de 2 s, potência de 60%, altura de -4 µm. Posteriormente, as análises foram realizadas com base software Harmony 4.5 (Perkin Elmer) e os dados comparados no software GraphPad Prism® 7.04 pelo teste de Tukey One Way  $p < 0,05$ .

### 3.1.3.3 Eletroporação

No método de eletroporação foram testados três tampões: o meio comercial OPTIMEM (Invitrogen, USA); tampão TbBSF (5mM KCl; 0,15mM CaCl<sub>2</sub>; 90mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 50mM HEPES pH 7,3) e meio DMEM sem soro e sem antibióticos e nas três concentrações do mesmo plasmídeo testado anteriormente (1µg; 2µg e 4µg), como controle positivo foi usado o plasmídeo

pgmax incluso no kit de eletroporação. Cerca de  $1 \times 10^6$  células foram lavadas com solução salina (PBS) e ressuspensas em 100  $\mu$ L do respectivo tampão e concentração de DNA do plasmídeo. Foi utilizado o equipamento Amaxa Nucleofactor (Lonza, USA) programa O-17 de acordo com o descrito por Maurisse et al., (2017), após o choque as células foram recuperadas durante 10 minutos em 100  $\mu$ L de meio RPMI com 10% de soro bovino fetal a 37°C e plaqueadas em meio DMEM suplementado com 10% soro, 1% L-glutamina e 1% antibiótico em placas de 96 poços. Para análise da porcentagem de células transfectadas foram adquiridas 25 fotos por poço na objetiva de 20X por meio do sistema de *high content imaging* Operetta CLS” (Perkin Elmer) conforme descrito anteriormente.

#### 3.1.3.4 Padronização da técnica de *sorting*

Como as células que receberam o plasmídeo px458 possuem o gene para expressão da proteína vermelha fluorescente (RFP) a fim de selecionar as células que receberam o plasmídeo foi realizada a estratégia de *sorting* com o citômetro de fluxo FACSARIA II (BD, USA). Após 48 horas da transfecção as células foram deixadas em suspensão com ação da enzima tripsina 0,25%, EDTA 0,02%, conforme descrito anteriormente, após a inativação da enzima com meio DMEM suplementado com soro fetal bovino, as células lavadas com solução salina (PBS), centrifugadas (700 x g, 5 minutos) e foram contadas com auxílio da câmara de Neubauer de forma garantir no mínimo  $1 \times 10^5$  células/ mL de suspensão, as células foram então ressuspensas em PBS suplementada com 10% soro fetal bovino e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina. No equipamento FACSARIA II (BD) os parâmetros foram ajustados com nozzle de 100 e filtro 2 para o FCS (tamanho), foi obtido o gráfico contagem x PE-A e a população negativa definida. Em seguida, foi colocado o tubo contendo células transfectadas com plasmídeo px458 o *sorting* foi realizado durante 20 minutos com uma taxa de fluxo igual 3, cerca de 150 eventos por segundo. As células selecionadas foram adquiridas em tubo falcon de 15 mL com meio de cultura suplementado com 10% soro fetal bovino e 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina e colocadas em placas de cultura de 6 poços (Jet Biofil®, China) com e sem revestimento com carboximetilcelulose 0,5% ou colágeno para

facilitar a aderência. O meio foi trocado a cada 3 dias até atingir uma confluência de 80%. O DNA foi extraído conforme método alcalino descrito no item 3.3.1

### 3.1.4 Construção do sgRNA para entrega da ribonucleoproteína

Para a aplicação da técnica com entrega da ribonucleoproteína foi sintetizado um DNA, de 179 pares de base em dupla-fita pelo método geneBlock da empresa IDT (Integrated DNA Technology, USA), com verificação do tamanho e integridade da sequência. A sequência de DNA sintetizada contém: (1) sequência do promotor T7 para realização da transcrição *in vitro* (2) sequência específica do guia (3) sequência do *tracrRNA* da SaCas9 conforme representado na Figura 3.3.

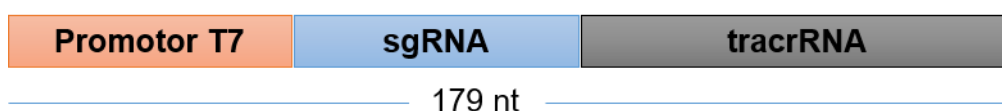


Figura 3.3 Estrutura do DNA sintetizado para ser transcrito em sgRNA.

As etapas de construção foram: (1) Amplificação das sequências; (2) Clonagem no vetor pGEM® T; (3) Confirmação das sequências e (4) Reação de transcrição *in vitro*.

#### 3.1.4.1 Amplificação das sequências

Cada sequência dos sgRNAs foi amplificada com a enzima Platinum™ *Pfx* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA), seguindo as recomendações do fabricante. O programa usado para a abertura inicial da fita do DNA a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos: (94°C por 15 segundos, 57°C por 30 segundos e 68°C por 30 segundos) e finalização a 68°C por 3 minutos. O produto de PCR foi purificado e a sequência inserida no vetor pGEM® T (Promega, USA).

#### 3.1.4.2 Inserção da sequência no plasmídeo pGEM®-T Easy

A amplificação do DNA com a enzima Taq DNA polimerase adiciona um desoxi-nucleotídeo adenina nas extremidades 5' do fragmento amplificado. O vetor pGEM®-T possui um nucleotídeo timina na extremidade 3' o que permite a ligação do inserto no plasmídeo com a enzima T4 ligase (Thermo Fischer, USA).

A ligação ao vetor de clonagem pGEM®-T Easy foi dada pela reação nas proporções recomendadas pelo fabricante. A reação foi incubada em temperatura ambiente durante 16 horas, decorrido o tempo, o volume total da reação foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* competentes. Após esse procedimento, essas células transformadas foram cultivadas em placas contendo LB/ágar com ampicilina, IPTG (isopropil-tio-galactopiranosídeo) e X-GAL e mantidas por aproximadamente 18 horas em estufa a 37 °C. Colônias brancas foram selecionadas e a presença do vetor com o inserto foi conferida por PCR de colônia. Com a sequência de DNA no vetor foi realizada a transcrição *in vitro* com o kit MEGAscript™ T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) para obtenção do RNA.

#### 3.1.4.3 Confirmação dos clones

Os clones obtidos foram confirmados pela técnica de PCR conforme descrito anteriormente, com o *primer forward* para a sequência do promotor T7 presente na sequência (GAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGA) e reverso (AAAAAATCTCGCCAACAAGTTGACGAGAT). Os plasmídeos foram enviados para sequenciamento pelo método de Sanger com os mesmos *primers* descritos e 200 ng de DNA plasmidial.

#### 3.1.4.4 Reação de transcrição *in vitro*

A reação de transcrição *in vitro* foi realizada com o kit MEGAscript™ T7 Transcription Kit (Invitrogen, Califórnia, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante, uma vez que o sgRNA possui o promotor T7. Para a reação de 20 µL foi otimizado uma concentração inicial de DNA de 40ng obtendo uma concentração de 2ng/µL de DNA dupla fita inicial por reação e a transcrição ocorreu durante 16 horas a 37°C. Após o período foi adicionado 1µL da enzima turbo DNase (presente no kit) durante 15 minutos a 37°C com o objetivo de degradar o DNA remanescente mantendo apenas RNA para purificação, nesta etapa todos as soluções e materiais utilizados eram livres de RNase. Como o RNA gerado tinha um tamanho menor que 200 nucleotídeos o método de purificação deste diferiu do sugerido no kit, sendo utilizada a precipitação com etanol absoluto gelado. Inicialmente os 20µL da reação foram diluídos em 115µL de água ultra-pura em tubo *ependorf*. Foi adicionado o volume de 15 µL de acetato de amônio agitando durante 15 segundos com auxílio do vortex. Para

precipitação foi adicionado 2,5 vezes o volume de etanol absoluto livre de RNase e a precipitação ocorreu durante 1 hora a -20°C. Após a incubação, a amostra foi centrifugada (4.800 x g; 30 minutos; 4°C) e o sobrenadante removido deixando apenas o precipitado de RNA. Este foi lavado com 500µL de etanol 75% e passado para um novo tubo *ependorf*, seguido de nova centrifugação (4.800 x g; 5 minutos; 4°C) e o sobrenadante cuidadosamente retirado. O *pellet* foi deixado secando a 65°C durante 3 minutos até evaporar o excesso de etanol e ressuspensão em 30 µL de água ultra-pura livre de RNase. A concentração de RNA obtido foi medida pela absorbância com uso do Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific USA). Após a etapa de adição de acetato de amônio 1µL do sgRNA foi misturado com 5µL de formaldeído *loading buffer* (incluso no kit) e 4µL de água livre de RNase e incubado a 75°C por 10 minutos, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 2% para separação por eletroforese conforme descrito anteriormente.

### **3.1.5 Reação de clivagem de DNA pelo complexo in vitro**

#### **3.1.5.1 Amplificação de fragmento do gene CFTR**

Para a reação de clivagem *in vitro* foram desenhados *primers* para amplificação de um fragmento de 906 pb do gene CFTR de forma que após a clivagem os fragmentos gerados possam ser visualizados em gel de agarose. A amplificação do fragmento foi realizada com o uso dos *primers*: CFTRforward: (CATGTGCCCTTCTCTGTGA) e CFTRreverse: (CTCTGCTGGCAGATCAATGC) com a enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Fischer Scientific, USA) de acordo com as recomendações do fabricante com o seguinte programa de amplificação: 94°C durante 2 minutos seguido de 35 ciclos (94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos; 68°C durante 1 minuto) e por fim uma etapa de extensão final a 68°C durante 3 minutos. O produto da PCR foi misturado com glicerol 5x e aplicado em gel de agarose 1% para separação em tampão TAE. Após a migração dos fragmentos por tamanho o fragmento do gene foi cortado do gel e purificado conforme instruções do fabricante do kit comercial *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits* (GE Healthcare, USA). A reação de clivagem foi realizada com o produto de PCR purificado.

### 3.1.5.2 Reação de clivagem *in vitro*

O sgRNA previamente purificado conforme descrito anteriormente foi diluído para concentração de 450nM conforme a equação (3.1)

$$mols\ RNA = \frac{massa\ do\ RNA\ (g)}{tamanho\ do\ RNA\ (nt) \times 321,47\ (\frac{g}{mol})}$$

Equação 3.1

A reação de clivagem *in vitro* seguiu diferentes proporções molar de (sgRNA: SaCas9: substrato). O sgRNA foi aquecido a 90°C durante 5 minutos para que a estrutura secundária se desfça, em seguida este foi misturado com a SaCas9 durante 15 minutos em temperatura ambiente seguindo a proporção de 1:1 para a formação do complexo sgRNA: SaCas9. Em seguida foi adicionada água livre de RNase e tampão de clivagem da SaCas9 5x (100mM HEPES pH 7,5; 500mM KCl; 25% glicerol; 5mM DTT; 2,5 mM EDTA pH 8; 10mM MgCl<sub>2</sub>). Por último, foi adicionado 9mM do substrato perfazendo 30µL de reação, conforme apresentado na Tabela 3.1.

Elementos da Reação	Volume/ Concentração
sgRNA (450nM)	3µL (45nM)
SaCas9 (450nM)	3µL (45nM)
Água RNase free	x µL (até 30 µL)
Tampão de clivagem 5x	6µL (1x)
Substrato (DNA)	x µL (9nM)

Tabela 3.1 – Elementos da reação de clivagem *in vitro*. São apresentados as respectivas quantidades e concentrações de cada componente para uma reação de 30µL.

A reação é incubada durante 3 horas a 37°C. Decorrido este tempo, a enzima é desnaturada a 80°C durante 20 minutos e o produto da reação foi visualizado através da separação em gel de agarose 1,5% em tampão TAE durante 1 hora a 90V, corado por GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA) e visualizado em fotodocumentador LPIX (Loccus Biotecnologia, USA) após exposição em luz ultravioleta.

### 3.1.6 Padronização da Transfecção da Ribonucleoproteína

As etapas de expressão e purificação da proteína Sacas9 não foram realizadas no trabalho, visto que a proteína recombinante purificada por

cromatografia de afinidade foi gentilmente cedida pela coorientadora, Dra. Lia Carolina Medeiros Soares Kuczera. A transfecção do complexo da ribonucleoproteína foi realizada de acordo com WANG et al, (2019) em que é transfectado 1 µg da proteína SaCas9 purificada e 0,5µg do sgRNA na proporção molar (1:1) seguindo a metodologia já descrita anteriormente com Lipofectamina 3000, em placa de 25 poços. Após 48 horas, as células foram tripsinizadas e diluídas em meio DMEM com 10% soro de forma a obter uma única célula por poço. O meio foi trocado a cada 7 dias até atingir 80% de confluência e o DNA de cada poço foi extraído com tampão alcalino conforme descrito no item 3.3.1.

### **3.2 Sincronização do Ciclo Celular**

#### **3.2.1.1 Determinação da concentração de droga**

Em placa de 96 poços (Jet Biofil®, China) foram colocadas, aproximadamente,  $2 \times 10^4$  células CFBE 508del 24 horas antes da adição das drogas. As drogas nocodazol (Sigma, USA) e hidroxiureia (Sigma, USA) foram diluídas para concentrações de 1µg/mL e 1000µg/mL respectivamente e foram diluídas a fim de se estabelecer uma escala logarítmica na base 10 em meio de diluição de droga (DMEM suplementado com 2% penicilina e estreptomicina e 2% de L-glutamina 20 mM) usando como fator de diluição a razão 2,15 (1 mL da solução com a substância e 1,15 mL de meio de diluição de drogas), as concentrações testadas estão apresentadas na Tabela 3.2. Em cada poço da placa foi adicionado 50µL de meio de cultura de rotina (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2% de L-glutamina) e 50 µL das drogas diluídas na respectiva concentração. As células ficaram em contato com as drogas durante 24 horas, após esse período o meio foi trocado por meio de rotina para recuperação das células durante 2 e 24 horas. O meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com solução fosfato salina de Dulbecco's (D-PBS) e 250 µL da solução de vermelho neutro na diluição de 0,758 mL de Neutral Red solution (Sigma, USA) foi adicionada em cada poço da placa. A incubação a 37°C ocorreu durante 3 horas, após esse período a solução de vermelho neutro foi retirada e uma lavagem com D-PBS realizada, seguida da adição de 100µL da solução descorante (50% etanol absoluto, 1% ácido acético e 49% água destilada). O ensaio foi incubado durante 20 minutos em temperatura ambiente no escuro. Após 15 minutos de repouso, a leitura da absorbância em 540nm foi



realizada em espectrofotômetro (Synergy H1 Hybrid Reader; Biotek, USA). A análise dos dados foi realizada com o software GraphPad Prism 7.04 usando a absorbância do controle sem tratamento como 100% de viabilidade, para verificar a significância foi realizado o teste de comparações de Dunnet's OneWay  $p < 0,05$ .

Diluição	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	log 10
D1	1000	3
D2	465,116279	2,66756
D3	216,333153	2,33512
D4	100,620071	2,00268
D5	46,8000331	1,67025
D6	21,7674573	1,33781
D7	10,1243987	1,00537
D8	4,70902266	0,67293

Tabela 3.2– Concentração de hidroxireia testada no ensaio de viabilidade celular

### 3.2.1.2 Ciclo Celular com Iodeto de Propídeo

Uma vez determinada a maior concentração da droga em que não há perda significativa da viabilidade celular, as drogas foram adicionadas ao meio de cultura na concentração determinada durante 24 horas. Após esse período em contato com as drogas e o período de recuperação, as células foram tripsinizadas com tripsina 0,25%, EDTA 0,02% e lavadas com PBS, seguidas de centrifugação (700 x g durante 5 minutos). O *pellet* de células foi ressuspense em solução gelada de etanol 70% para fixação e incubadas durante 2 horas a 4°C. Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas com PBS e centrifugadas (700 x g, 5 minutos) o *pellet* foi ressuspense em PBS e adicionado ao mesmo volume de solução de coloração com iodeto de propídeo (3,4mM Tris HCl pH 7,4; 0,1% Nonidet P40; 700U RNase A DNase free; 10mM NaCl; 30 $\mu\text{g/mL}$  de iodeto de propídeo) incubando durante 10 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS e centrifugadas (700xg; 5 minutos) o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em PBS e passadas em citômetro de fluxo (FACS CANTO II, BD, USA). A análise dos dados foi realizada com o software FlowJo. A estratégia de seleção das *gates* de cada fase do ciclo celular é apresentada na Figura 3.4. Inicialmente, dentro da população de células CFBE, foi selecionada a população de células marcadas com iodeto de propídeo e as *gates* propostas pelo modelo *pragmático de Dean-Jett-Fox* que estabelece que as populações seguem distribuições

gaussianas para as fases G0/G1 e G2/M e uma distribuição polinomial de segunda ordem para a fase S. Definidas as *gates* para o controle estas foram reproduzidas para as células tratadas.

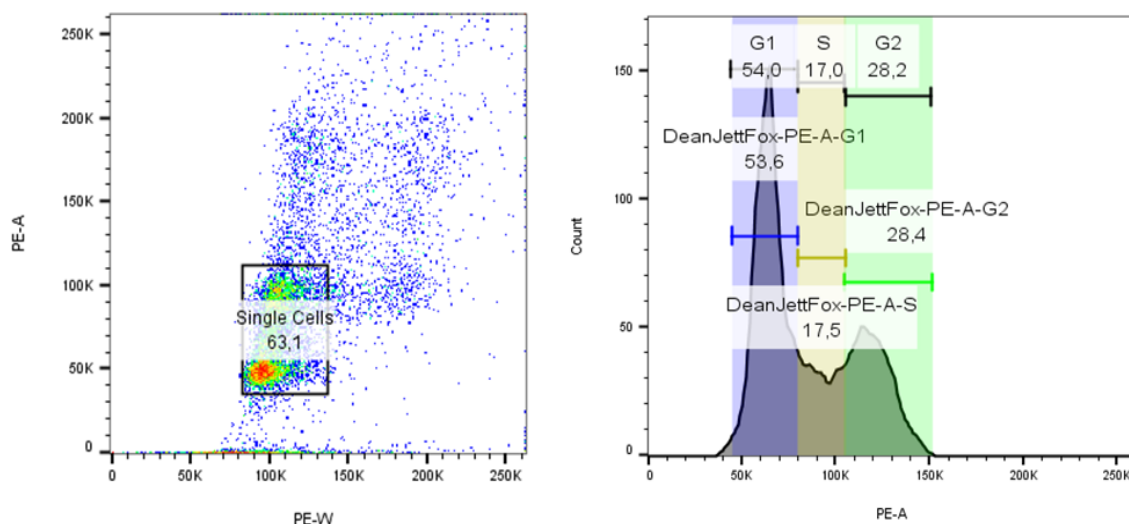


Figura 3.4 – Estratégia de estabelecimento de gates de acordo com o modelo de Dean Jett Fox no software FlowJo

### 3.3 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE DETECÇÃO

#### 3.3.1 Extração DNA das células

A extração do DNA das células foi realizada com o kit comercial Qiamp DNA mini (Qiagen, TX, EUA) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Na aplicação deste método de extração seguem as etapas de lise celular, lavagem com tampões específicos e utiliza-se uma coluna com filtro que tem afinidade pelo DNA. Após as etapas de purificação, o DNA é eluído em água e sua concentração dosada pelo espectrofotômetro Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific USA). Com a técnica foi obtido DNA com grau de pureza e concentração adequada, no entanto são necessárias grandes quantidades de células iniciais (cerca de  $5 \times 10^5$ ), pois há perda de material durante as etapas de purificação. As etapas de padronização da qPCR e PCR convencional foram realizadas com o DNA extraído desta maneira.

Para solucionar o problema da quantidade inicial de células foram testados protocolos de extração de DNA aplicado a baixas quantidades de células ( $2 \times 10^4$ ) de acordo com o descrito por Ramlee e colaboradores (2015)

com o tampão de hidróxido de sódio (50 mM NaOH, 0,4 mM EDTA), denominado como Extração Alcalina. As células tiveram o meio de cultivo retirado e foram lavadas duas vezes com solução salina balanceada sem cálcio e magnésio (BSS-CMF), as células foram tripsinizadas com tripsina 0,25% EDTA 0,02% e a enzima foi inativada com meio DMEM contendo soro, as células foram centrifugadas (2000 rpm, 5 minutos) e lavadas com solução salina (PBS). Cerca de 40 µL da suspensão celular foi misturada com 40 µL do tampão hidróxido de sódio e aquecido a 100°C durante 30 minutos, o pH foi neutralizado com 40 mM Tris-HCl (pH 5). A concentração de DNA obtida foi medida com espectrofotômetro Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific USA).

### **3.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção da mutação F508del**

#### **3.3.2.1 qPCR**

Para identificação da mutação ou ausência desta a nível de DNA genômico, inicialmente foram testados os *primers* descritos por (FIGUEREDO LAGO et al., 2017), porém, estes não mostraram especificidade e seu uso foi descontinuado. Em seguida, foram utilizados *primers* específicos purificados por PAGE de acordo com (PERONE et al., 2010) utilizando um *primer* reverso comum com sequência (TGCAAGCTTCTTAAAGCATA), um *primer forward* para célula selvagem (ACCATTAAGAAAATATCATCTT) e um *primer forward* para célula mutante (ACCATTAAGAA AATATCATTGG). Cada reação de 10µL com seu respectivo *primer forward* foi realizada com GoTaq® qPCR Master Mix (PROMEGA, USA), 5 µM de cada primer, água livre de nuclease e no mínimo 200 ng de DNA genômico, de célula CFBE 508del para mutante e de célula-tronco mesenquimal para selvagem, no equipamento de PCR quantitativa Roche LightCycler® 96 (ROCHE, USA). Foram testadas diferentes temperaturas de anelamento e o programa (95°C por 25 segundos, 62°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos) apresentou o melhor resultado. As curvas de amplificação foram analisadas no software Light Cycler 96 SW 1.1.

#### **3.3.2.2 Curva quantitativa DNA selvagem e mutante**

A fim de mensurar qual a porcentagem de DNA selvagem, presente em uma amostra, detectada pela técnica de qPCR foram realizadas misturas com

diferentes porcentagens de DNA selvagem e mutante. As porcentagens de DNA estão expressas na Tabela 3.3 sendo que 100% equivale a 240ng de DNA. A reação de qPCR seguiu o descrito no tópico anterior.

Diluição	DNA selvagem (%)	DNA mutante (%)
D1	100	0
D2	75	25
D3	50	50
D4	25	75
D5	12,5	87,5
D6	6,25	93,25
D7	0	100

Tabela 3.3 – Concentrações de DNA selvagem para averiguar o limite de detecção da técnica de qPCR

### 3.3.2.3 PCR convencional

A detecção por PCR convencional foi realizada utilizando sequências de *primers* previamente descritos (PERONE et al., 2010) em uma reação de 20µL usando 3,5µL mistura de PCR kit NAV (IBMP, BRASIL) com 200 ng de DNA e 1 µM de cada primer. A reação foi amplificada no termociclador ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA) e o programa mais adequado foi a 95°C por 5 minutos para desnaturação, seguido de 35 ciclos de 95°C durante 25 segundos, 58°C durante 30 segundos, 72°C por 30 segundos e por fim extensão final a 72°C por 5 minutos. Após a amplificação, o produto de PCR foi centrifugado (1000 rpm, 1 min) para sedimentar resíduos da mistura de PCR e o sobrenadante misturado com glicerol 5x e aplicado em gel de agarose 2%, conforme descrito anteriormente.

### 3.3.3 Imunofluorescência

Em placa de 24 poços  $2 \times 10^4$  células (CFBE *willd type*, CFBE 508del, HUVEC e CTM) foram semeadas sobre vidro (lamínula) ou plástico aderente. Após a aderência das células e cerca de 80% de confluência as células foram lavadas com PBS e realizada fixação com metanol absoluto gelado durante 20 minutos, seguida da adição de paraformaldeído (PFA) 4% durante 10 minutos e 3 lavagens com solução salina (PBS), conforme descrito por (TOUSSON et al., 1998). A permeabilização da membrana celular com PBS 0,05% de Triton x-100

durante 20 minutos sendo realizadas 3 lavagens com PBS. O bloqueio foi realizado com PBS contendo 5% de proteína de soro bovina (BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente. O anticorpo primário testado foi o CFTR-mAb 596 da Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics ([www.cftrfolding.org/CFFTReagents.htm](http://www.cftrfolding.org/CFFTReagents.htm)) na diluição de 1:250 (MEEGEN et al., 2013a) na solução de bloqueio durante 16 horas a 4°C. Foram realizadas 3 lavagens com PBS 0,05% *tween 20* e o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com o fluoróforo AlexaFluor 488 (ThermoFisher Scientific, USA) foi incubado na diluição de 1:600 na solução de bloqueio durante 1 hora. Após este período, foram realizadas 3 lavagens com PBS 0,05% *tween 20* e o núcleo das células foi marcado com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante 10 minutos em temperatura ambiente. Foram realizadas 3 lavagens com PBS e as amostras foram mantidas a 4°C com PBS. As imagens foram obtidas com o microscópio óptico invertido de fluorescência (LEICA AF6000 Modular System) em aumento de 40 e 1000 vezes. Para análise dos parâmetros de número de núcleos e porcentagem da área demarcada, foram adquiridas 25 fotos por poço na objetiva de 20X por meio do sistema de *high content imaging* Operetta CLS™ (Perkin Elmer) utilizando-se os seguintes parâmetros: os núcleos foram evidenciados com a coloração de DAPI, com tempo de aquisição de 10 ms, potência de 40% e altura de -2 µm para autofoco em excitação de transmissão e emissão em 655-760nm. A marcação do canal CFTR pelo anticorpo mAb 596 conjugado com Alexa Fluor 488 foi evidenciada no filtro FITC com excitação em 355-385 nm e emissão em 430-500 nm com tempo de aquisição de 200 ms, potência de 60% e 0 µm de altura. Posteriormente, as análises foram realizadas com base software Harmony 4.5 (Perkin Elmer) e analisadas no GraphPad Prism® 7.04 e a comparação das médias com o teste de Tukey One Way  $p < 0,05$ .

### **3.3.4 Avaliação da Edição**

#### **3.3.4.1 Ribonucleoproteína**

Após determinadas as condições, as células foram transfectadas com Lipofectamina 3000, conforme descrito anteriormente na presença e ausência da droga hidroxireia. Após 48 horas o DNA foi extraído com tampão alcalino para avaliação dos clones corrigidos por PCR.

#### 3.3.4.2 Plasmídeo

As células foram transfectadas com Lipofectamina 3000, conforme descrito anteriormente na presença e ausência da droga hidroxiureia e após 24 horas as células não tratadas com a droga foram submetidas a separação pela técnica de *sorting* no citômetro de fluxo FACSARIA II (BD, USA). As células foram recuperadas em meio DMEM suplementado 20% de soro bovino fetal em placa de cultura de 6 poços revestida com gelatina. As células foram expandidas até  $5 \times 10^5$  para extração do DNA e avaliação pelas técnicas de PCR, qPCR e sequenciamento por Sanger.

#### 3.3.4.3 Preparo de amostras para sequenciamento

Para verificar se houve edição no gene CFTR, um fragmento de 260pb contendo a região de interesse foi amplificado por PCR utilizando os *primers forward* (ATGGGAGAACTGGAGCCTTC) e *reverso* (TTGGCTCCATATTCAATCGGT). A reação foi realizada com a enzima Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de amplificação foi realizada no termociclador ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA), seguindo o programa: 98°C durante 2 minutos; 35 ciclos a 98°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos; 72°C durante 30 segundos e por fim uma etapa de extensão final a 72°C durante 3 minutos. O produto da PCR foi corado com glicerol 5x e aplicado em gel de agarose 2% para separação em tampão TAE. Após a migração do DNA por tamanho, o fragmento do gene foi cortado do gel e purificado conforme instruções do fabricante do kit comercial *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits* (GE Healthcare, USA). Para a reação de sequenciamento foi utilizado 10ng/ $\mu$ L da amostra purificada e a sequência dos *primers* descritos anteriormente. As amostras preparadas foram enviadas para o sequenciamento de Sanger.

#### 3.3.4.4 Avaliação de inserções e deleções

A avaliação dos eventos de inserção e deleção (*indels*), nas células que receberam o plasmídeo e foram submetidas ao *sorting*, foi realizada com a comparação dos picos dos histogramas obtidos pelo sequenciamento do DNA das células não editadas (CFBE 508del). O alinhamento para comparação das sequências foi realizado com a ferramenta Clustal

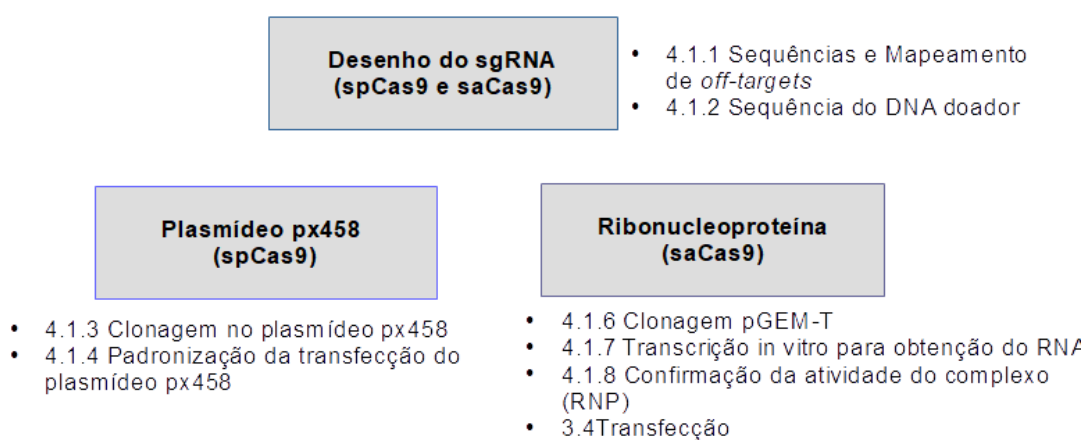
(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e a quantidade de inserções e deleções foi calculada pelo software TIDE (<https://tide.nki.nl/>) do trabalho de Brinkman e colaboradores (2014).

## 4 RESULTADOS

O fluxograma disposto na Figura 4.1 apresenta as etapas de desenvolvimento do projeto e os resultados serão apresentados seguindo a ordem descrita abaixo.

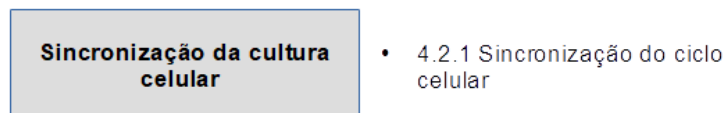
### Etapa 1 – Construção de ferramentas

---



### Etapa 2 – Reparo Dirigido por Homologia

---



### Etapa 3 – Avaliação da Edição

---

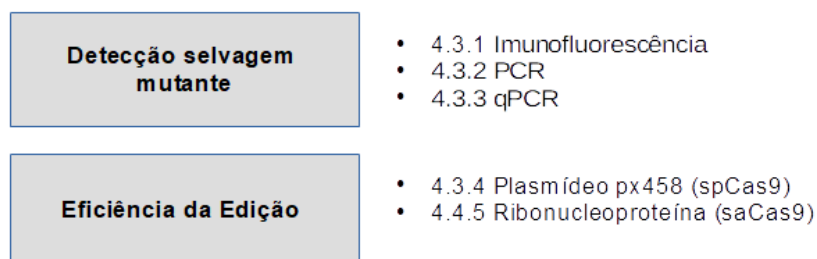


Figura 4.1- Fluxograma geral mostrando as etapas realizadas no desenvolvimento do trabalho

## 4.1 Etapa 1 – Construção de Ferramentas

### 4.1.1 Desenho do sgRNA e mapeamento de off-targets

Para determinar a sequência do sgRNA que dará especificidade ao gene CFTR pelo sistema CRISPR, foi utilizado o programa CHOPCHOP que apresentou várias possibilidades de sequências de sgRNA diferentes. Estas sequências foram classificadas de acordo com a predição de sua eficiência (XU et al., 2015) que leva em consideração a quantidade de *off-targets* para até 3 mismatches e o conteúdo GC, que deve estar entre 30% e 80% para não afetar a estrutura secundária da molécula, pois a estrutura secundária influencia a eficiência (BRUEGMANN, FLADUNG; 2019). A predição in silico leva em consideração aspectos estruturais do sgRNA, como a presença de resíduos de purina nos últimos nucleotídeos que melhoram a interação do sgRNA com a Cas9. Os valores preditos para a eficiência variam de 0 até 1, em que quanto mais próximo de 1 mais eficiente (XU et al., 2015).

Para SpCas9 foram apresentados 32 possíveis sgRNAs e 12 para SaCas9. As mesmas sequências de sgRNA também foram preditas pelo programa EuPadget com a eficiência calculada de acordo com Doench e colaboradores (2014). Para garantir a especificidade do sgRNA, uma outra ferramenta online denominada CRISPOR, utilizando outro algoritmo, foi utilizada para verificar a predição de eficiência (DOENCH et al., 2014) através da quantidade de *off-targets* totais para até 4 mismatches, quantos destes *off-targets* estavam próximos a uma sequência PAM e a localização no genoma. Para a escolha do sgRNA foram considerados os seguintes critérios: (1) proximidade do sgRNA a região a ser corrigida; (2) quantidade de off-targets para até 3 mismatches; (3) localização dos off-targets no genoma.

As sequências dos sgRNA escolhidos, bem como dados de predição de eficiência e quantidade de *off-targets* estão apresentados na Tabela 4.1.



RNAguia	Sequência (5'→3')	Off-targets	Localização off-targets	Eficiência Xu et al., (2015)	Eficiência Doench et al (2014)
SaCas9 1546	ATGGGAGAACTGGAGCCT TCA	4	Intron e intergênica	0,38	0,61
SaCas9 1648	ATATCATTGGTGTTCCTA TG	7	Intron e intergênica	0,43	0,50
SaCas9 133	ATAATCCAGGAAAAGTGA GAA	3	Intron e intergênica	0,56	0,50
SpCas9 1546	GGGAGAACTGGAGCCTTC AG	38	Éxon: FBXO25 CNTNAP2	0,60	0,57
SpCas9 1637	AATGGTGCCAGGCATAAT CC	12	Éxon: RP11-281P23.2	0,43	0,65
SpCas9 173	AGTTTCTTACCTCTTCTAG T	27	Éxon: IL7R	0,42	0,50

Tabela 4.1- Características teóricas dos sgRNAs selecionados pelos programas CHOCHOP e EuPadget. A Tabela apresenta a nomenclatura para cada sgRNA usada, sua sequência, a quantidade (3 mismatches) e localização destes off-targets no genoma humano a partir dos dados obtidos pelo software CRISPOR, além disso são comparadas as eficiências preditas por dois algoritmos diferentes.

De maneira geral, os sgRNAs desenhados para a proteína SaCas9 apresentam menor quantidade de *off-targets* predita, sendo que estes estão localizados em regiões de introns e intergênicas. Por outro lado, para a proteína SpCas9 são encontrados mais *off-targets* preditos em éxons e regiões codificantes do DNA. Essa diferença na quantidade de *off-targets* preditos, se deve a especificidade decorrente do sítio PAM que cada uma das proteínas utiliza para reconhecer e clivar o DNA genômico. A proteína SpCas9 reconhece um sítio PAM de 3 nucleotídeos (NGG), em que N representa qualquer base, o que torna esse sítio mais comum no DNA genômico sendo encontrado em uma a cada 8 bases. Já a proteína SaCas9 reconhece o sítio PAM NNGRR(T), em que R são bases púricas (A ou G), estando este sítio presente em 1 a cada 32 bases na sequência do DNA. Embora este sítio tenha menor prevalência no genoma, com menos possibilidades para o desenho de sgRNAs para o locus desejado, a quantidade de *off-targets* também é reduzida (MEDEIROS et al., 2017).

Segundo a predição *in silico* com a proteína SpCas9, o sgRNA 1637 poderia reconhecer o gene RP11-281P23.2, localizado no cromossomo 4, descrito pela base de dados Ensembl como um RNA longo não codificante (lncRNA) com 6 variantes descritas (ENSG00000249631) e com função desconhecida. Considerando o sgRNA 173 poderia afetar o gene IL7R, codificante da cadeia alfa do receptor da interleucina 7 (IL-7) e do receptor TSLP, estes receptores são incorporados na membrana celular das células do sistema imunológico para interação com a citocina IL-7 que regula o desenvolvimento e maturação de linfócitos B e ativação de linfócitos T (LIN et al., 2017). Por fim, o sgRNA 1546 (SpCas9) poderia afetar dois genes: FBXO25 e CNTNAP2. De acordo com as bases de dados NCBI, o gene FBXO25 apresenta três isoformas distintas e codifica para um membro da família da proteína F-box. Esta proteína é caracterizada por um motivo de aproximadamente 40 aminoácidos que faz parte de uma das quatro subunidades de um complexo proteico que atua na ubiquitinação dependente da fosforilação. O gene CNTNAP2 abrange quase 1,5% do cromossomo 7 e é um dos maiores genes do genoma humano, membro da superfamília da neurexina que codifica uma proteína transmembranar localizada nos axônios mielinizados. Esta proteína medeia as interações entre neurônios e células da glia durante o desenvolvimento do sistema nervoso sendo também envolvida com os canais de potássio nos axônios diferenciadores atuando em múltiplos processos fundamentais no sistema nervoso em desenvolvimento e maduro (RODENAS-CUADRADO; HO; VERNES, 2014). Um *off-target* nesta região seria um problema visto que o gene CNTNAP2 tem sido estudado em distúrbios do desenvolvimento neurológico, incluindo a síndrome de Gilles de la Tourette, esquizofrenia, epilepsia, autismo, TDAH e deficiência intelectual.

Uma vez que os *off-targets* foram mapeados, os valores para eficiência predita foram avaliadas para cada sgRNA visto que seu cálculo leva em conta parâmetros como a posição de nucleotídeos específicos na sequência alvo, a acessibilidade do local alvo e a sequência de suas regiões flancoadoras (LABUN et al., 2019). A análise de diferentes parâmetros permite a predição de eficiência de sgRNAs com base em suas características estruturais. No trabalho de Doench e colaboradores (2014) foi analisada a atividade de 1.841 sgRNAs

no nocaute de genes humanos e murinos construindo um modelo preditivo da atividade do sgRNA para melhorar o desenho do mesmo (DOENCH et al., 2014). De maneira geral, foi determinado que sgRNAs com conteúdo de GC muito alto tende a ser menos ativo, além disso, há uma sutil preferência observada pela fita antisense. Do ponto de vista estrutural, foi mostrado que determinados nucleotídeos em dadas posições melhoram a eficiência, por exemplo a presença de guanina na posição 20, nucleotídeo adjacente ao PAM, faz com que o sgRNA seja mais ativo.

Alguns dos algoritmos usados para a predição da atividade do sgRNA, como E-CRISPR e CHOPCHOP, seguem um modelo de regressão linear baseados nos dados de nocaute e inserção no modelo zebra-fish. A aplicação desse modelo a outras espécies recebe resultados piores em comparação com outras ferramentas (CUI et al., 2018), conforme observado na Tabela 4.1. Logo, mesmo com a predição e otimização do sgRNA com o uso dos softwares é necessário avaliar o reconhecimento da sequência alvo e clivagem pela proteína Cas9.

#### **4.1.2 Sequência do DNA doador**

Diferentes abordagens têm sido utilizadas para melhorar o reparo dirigido por homologia, incluindo a entrega de moléculas de DNA dupla-fita (dsDNA) circulares ou lineares bem como oligonucleotídeos de simples fita (ssDNA) (WANG et al., 2018). Os oligonucleotídeos de simples fita apresentam algumas vantagens como menor custo para síntese e menor frequência de inserção aleatória no genoma. Modelos de DNA doador construídos em fita simples (ssDNA) foram utilizados com sucesso para HDR em células de mamíferos com uma frequência do reparo por HDR aumentados em até 30% (YEH; RICHARDSON; CORN, 2019).

O tamanho do DNA doador influencia na eficiência, sendo os maiores possuindo melhores resultados, como o aumento na eficiência do HDR em 26% utilizando um DNA doador de 600pb (ZHANG et al., 2017). Em modelo de zebra-fish, parâmetros como comprimento, complementaridade da cadeia e a simetria da sequência foram avaliados. De modo geral, Boel e colaboradores (2018) mostram que a taxa total do reparo dirigido por homologia varia entre 4% a 8%, sendo maior quando o comprimento do molde ssDNA aumenta de 60 para 120

nucleotídeos, porém os dados obtidos pelos autores não permitiram correlacionar a preferência do sentido da fita (sense ou antisense) para melhorar este tipo de reparo (BOEL et al., 2018).

Como é necessário fornecer um DNA doador que servirá como molde para a correção via reparo dirigido por homologia (HDR), a sequência utilizada nesse trabalho contém os três nucleotídeos CTT no éxon 10, local em que está localizada a mutação F508del no gene CFTR. Para este fim, o DNA molde foi sintetizado pela empresa IDT possuindo 180 bases em simples fita e que abrange todos os sítios respectivos aos sgRNA definidos anteriormente. A sequência utilizada, sentido 5'→ 3' com os nucleotídeos necessários para correção mutação F508del evidenciada em vermelho:

```
TGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGGTAAAATTAAGCACAGTGGGAAGAATT  
TCATTCTGTTCTCAGTTTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATA  
TCATCTTTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCATCAAAGC  
ATGCCAACTAGAAGAGGTAAGAAACT.
```

#### 4.1.3 Construção do sgRNA no plasmídeo

A sequência dos sgRNAs anelados e fosforilados foram inseridos no plasmídeo px458 pela reação de ligação com a enzima T4 ligase, seguido de transformação em bactérias e o crescimento em placa com antibiótico para seleção. Foram selecionadas 8 colônias, realizada PCR de colônia com *primers* específicos e todas amplificaram o fragmento de DNA no tamanho esperado (dados não mostrados). Com os clones positivos, foi realizada a purificação dos plasmídeos por MiniPrep de dois clones para cada construção. A sequência inserida foi confirmada tanto pela amplificação com o primer reverso CMVR e o *forward* específico do sgRNA que gera um produto de 350 pb, bem como, com o primer U6 e o reverso específico do sgRNA que gera um produto de 290 pb conforme esquematizado na Figura 4.2.

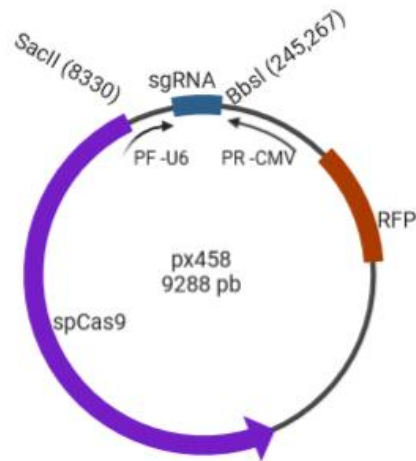


Figura 4.2 Desenho esquemático representando o plasmídeo px458. Os primers que foram utilizados estão indicados como: primer forward (PF-U6) e primer reverso (PR CMVR) desenhados próximos a sequência do sgRNA. As enzimas de restrição utilizadas (SacII) e BbsI estão representadas assim como a posição de clivagem no plasmídeo.

Na Figura 4.3 A as setas azuis indicam o produto amplificado de um dos clones de cada construção. Como controle foi usado o plasmídeo px458 que não possui nenhum sgRNA inserido no locus para mostrar que não há amplificação da região na ausência da sequência do sgRNA. Para confirmar a construção, a reação de digestão com a enzima BbsI foi realizada nos clones positivos. Visto que o plasmídeo que contém a sequência do sgRNA teve o sítio da enzima BbsI destruído, este apresentará apenas uma clivagem referente ao corte com a enzima de restrição SacII. Para o plasmídeo fechado, que estará com o sítio da enzima BbsI, espera-se duas clivagens e liberação de um fragmento de 500pb. Na Figura 4.3 B. pode-se observar dois fragmentos no plasmídeo controle (500pb e 2kb) sinalizados pelas setas azuis e apenas a abertura dos clones de cada uma das construções. Ainda que os resultados obtidos por PCR e digestão enzimática já se mostrassem suficientes como confirmação da inserção da sequência no plasmídeo, os clones obtidos foram sequenciados pelo método de Sanger e a sequência exata de cada sgRNA corroborada a sequência prevista Figura 4.3 C.

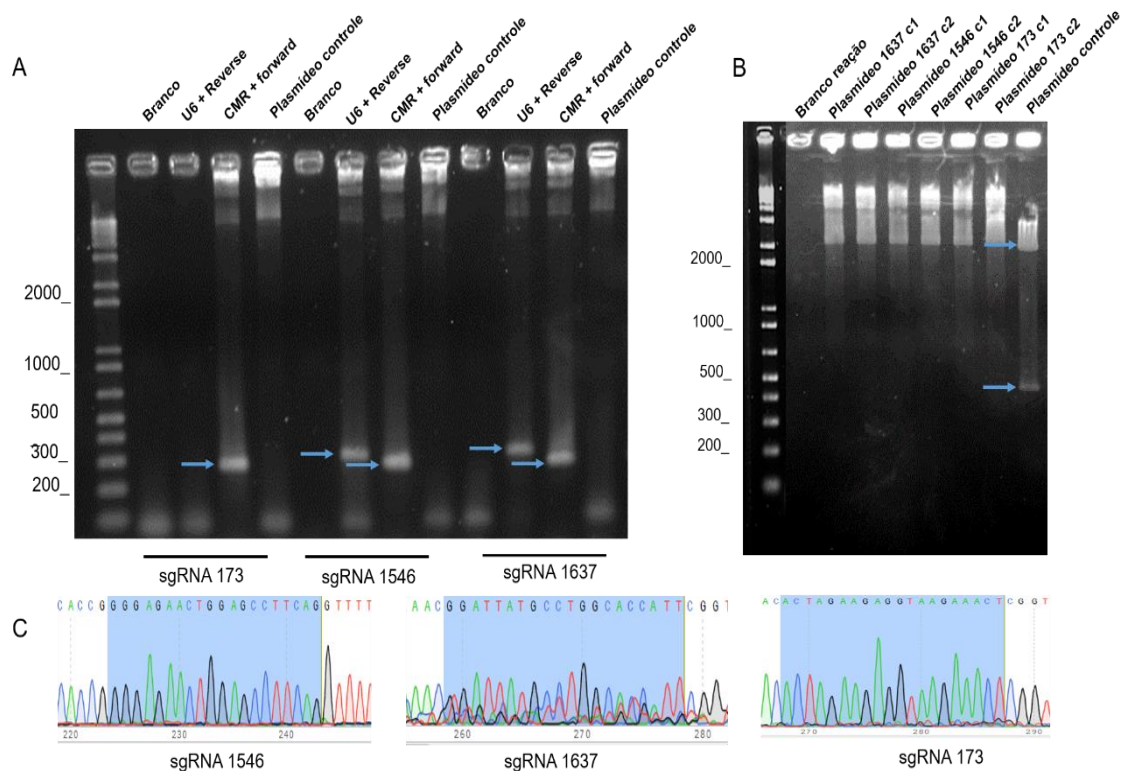


Figura 4.3 Confirmação da construção do plasmídeo px458 com as sequências de sgRNA por diferentes estratégias. (A) Amplificação por PCR do plasmídeo purificado dos fragmentos de 290pb e 350pb com a sequência específica do sgRNA em gel de agarose 2% com marcador de peso molecular de 1kb, corado por GelRed® Nucleic Acid Gel Stain e visualizado em fotodocumentador LPIX após exposição luz ultravioleta. (B) Digestão com a enzima de restrição BbsI e Sac II evidenciando destruição do sítio da BbsI quando a sequência do sgRNA está inserida no plasmídeo em comparação com plasmídeo controle que apresenta duas bandas, produto aplicado em gel de agarose 2% (C) confirmação da sequência de cada sgRNA no plasmídeo px458 pelo método de sequenciamento de Sanger.

Os métodos utilizados confirmaram a inserção da sequência no plasmídeo e a ferramenta de edição por plasmídeo pode ser testada. Para este fim, se fez necessário padronizar o método de transfecção nas células de epitélio pulmonar (CFBE), a fim de otimizar as variáveis. Na determinação do melhor método de transfecção, para o plasmídeo px458, foram testadas duas metodologias sendo uma baseada em método químico (Lipofectamina 3000) e outra por método físico (eletroporação).

#### 4.1.4 Padronização do método de transfecção para plasmídeo

A membrana celular é composta por uma bicamada lipídica com espessura de cerca de 5 nm, que funciona como uma barreira para os componentes do ambiente extracelular (BOLHASSANI; KHAVARI; ORAFA, 2014). Os métodos de transfecção tem como objetivo inserir material genético, normalmente DNA ou RNA, no núcleo das células alvo. Diferentes parâmetros podem influenciar a seleção do método de entrega, incluindo eficiência da transfecção, toxicidade, viabilidade celular, tipo de célula (linhagem ou primária), contexto celular (*in vivo*, *in vitro*, *ex vivo*), capacidade da célula em receber o material, tipo de material genético (DNA, RNA, mRNA, iRNA, proteína), reprodutibilidade, facilidade de uso e custo-benefício (GHARAATI-FAR et al., 2018).

Os métodos de transfecção físicos empregam força física para neutralizar a barreira da membrana celular, facilitando a entrega do material genético (RAMAMOORTH; NARVEKAR, 2015). Dentre os métodos físicos disponíveis (eletroporação, injeção hidrodinâmica, micro injeção, deformação mecânica, ultrassom, laser e biobalística), a eletroporação é a mais utilizada em laboratório, uma vez que pode ser usada para entregar uma variedade de moléculas, incluindo proteínas e ácidos nucleicos, nas células de mamíferos (LIU et al., 2017).

Na eletroporação um campo elétrico maior que a capacitância da membrana da célula é aplicado formando uma diferença de potencial em um ponto específico na superfície celular (RAMAMOORTH; NARVEKAR, 2015). A diferença de potencial aumenta a permeabilidade da membrana plasmática temporariamente, formando poros por um curto período de tempo na ordem de nanosegundos, este estado permeabilizado é transitório e permite a entrada das moléculas (BOLHASSANI; KHAVARI; ORAFA, 2014). A permeabilidade da membrana é controlada pela intensidade do campo elétrico aplicado, número de pulsos elétricos e pela duração do pulso, nos experimentos de eletroporação realizados nesse trabalho foi utilizado o programa O-17 (MAURISSE et al., 2010) e foram testadas diferentes tampões e concentração do plasmídeo.

A Figura 4.4 apresenta imagens representativas de uma das condições testadas da transfecção das células CFBE após 48 horas, com 2µg/mL de plasmídeo p<sub>gmax</sub> nos tampões OPTIMEM e TsbBuffer. Imagens de microscopia em contraste de fase e com o filtro FITC das células transfectadas com o plasmídeo p<sub>gmax</sub> expressando a proteína verde fluorescente (GFP) foram obtidas para determinação da porcentagem da transfecção (Figura 4.6). O cálculo dessa porcentagem foi o número de células que expressam fluorescência pelo número total de células através da marcação dos núcleos com DAPI. De maneira geral, as imagens obtidas revelam a baixa eficiência, variando de 10% a 15%, na internalização do plasmídeo, (Figura 4.4 B e 4.4 D) com todos os tampões e o programa O-17 testado. Além disso, observou-se após 48 horas, poucas células aderidas na placa de cultura, grande quantidade de células mortas e *debris* celulares no sobrenadante, o que pode ser visualizado nas imagens de microscopia em contraste de fase (Figura 4.4 A e 4.4 C).

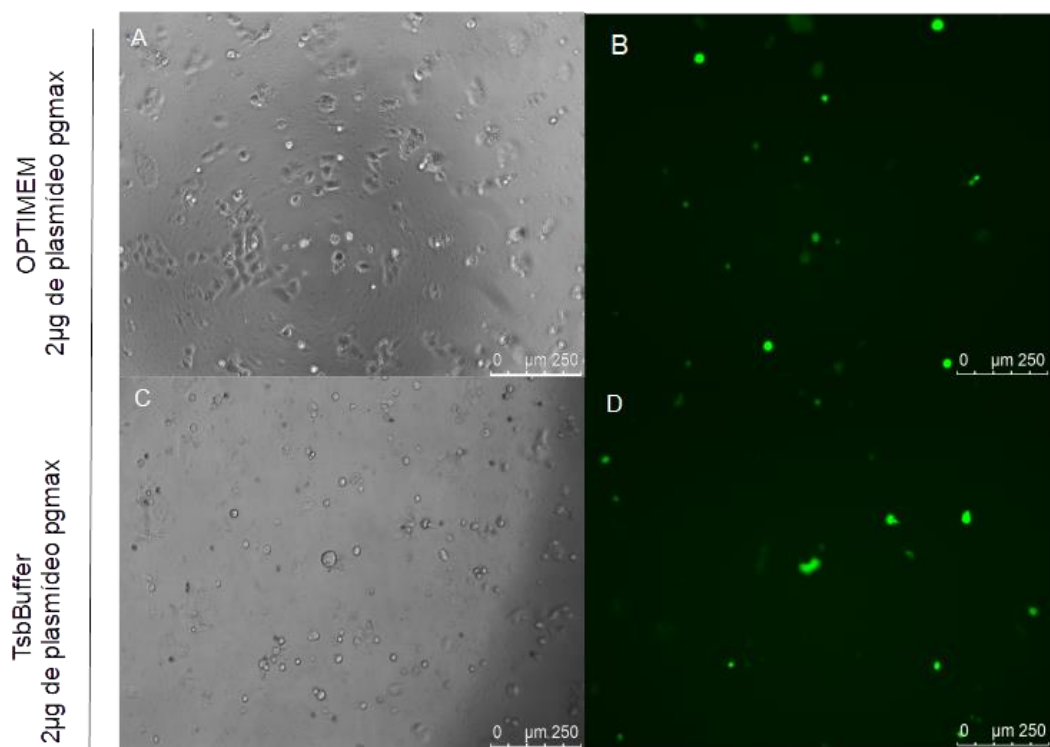


Figura 4.4 – Transfecção por eletroporação usando os tampões OPTIMEM e TsbBuffer e 2µg do plasmídeo p<sub>gmax</sub>. Em A e C – microscopia de contraste de fase e em B e D filtro FITC evidenciando a transfecção com o plasmídeo p<sub>gmax</sub> e a célula expressando GFP que foi usado



como controle do experimento. As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência com lente objetiva com aumento de 20 vezes.

A Figura 4.5 mostra as células transfectadas com o plasmídeo px458 e a fluorescência visualizada com o filtro TRITC, uma vez que as células que receberam o plasmídeo px458 expressam: o sgRNA, SpCas9 e a proteína vermelha fluorescente (RFP). A porcentagem da transfecção foi calculada de maneira semelhante à descrita anteriormente (número de células expressando fluorescência pelo número de células totais com núcleos marcados com DAPI). A análise foi realizada com as outras concentrações de plasmídeos (1 µg/mL, 2 µg/mL e 4 µg/mL) nos três tampões (OPTIMEM, TbsBuffer e DMEM sem soro e antibióticos) e os dados de comparação estão apresentados na Figura 4.6. Quando a transfecção foi realizada com o plasmídeo px458 observou-se poucas células expressando RFP (Figura 4.5 B, Figura 4.5 D e Figura 4.5 F) para todos os tampões e concentrações de DNA testadas, indicando uma baixa eficiência na aplicação desta metodologia. Utilizando DMEM sem soro e antibióticos se observou maior quantidade de células mortas e *debris* no sobrenadante (Figura 4.5 E), evidenciando que este não seria um bom tampão de eletroporação para este tipo de célula. Por outro lado, o tampão OPTIMEM apresentou um melhor desempenho quanto a manutenção da integridade celular (Figura 4.5 A) porém, não foi eficiente quanto a incorporação do plasmídeo.

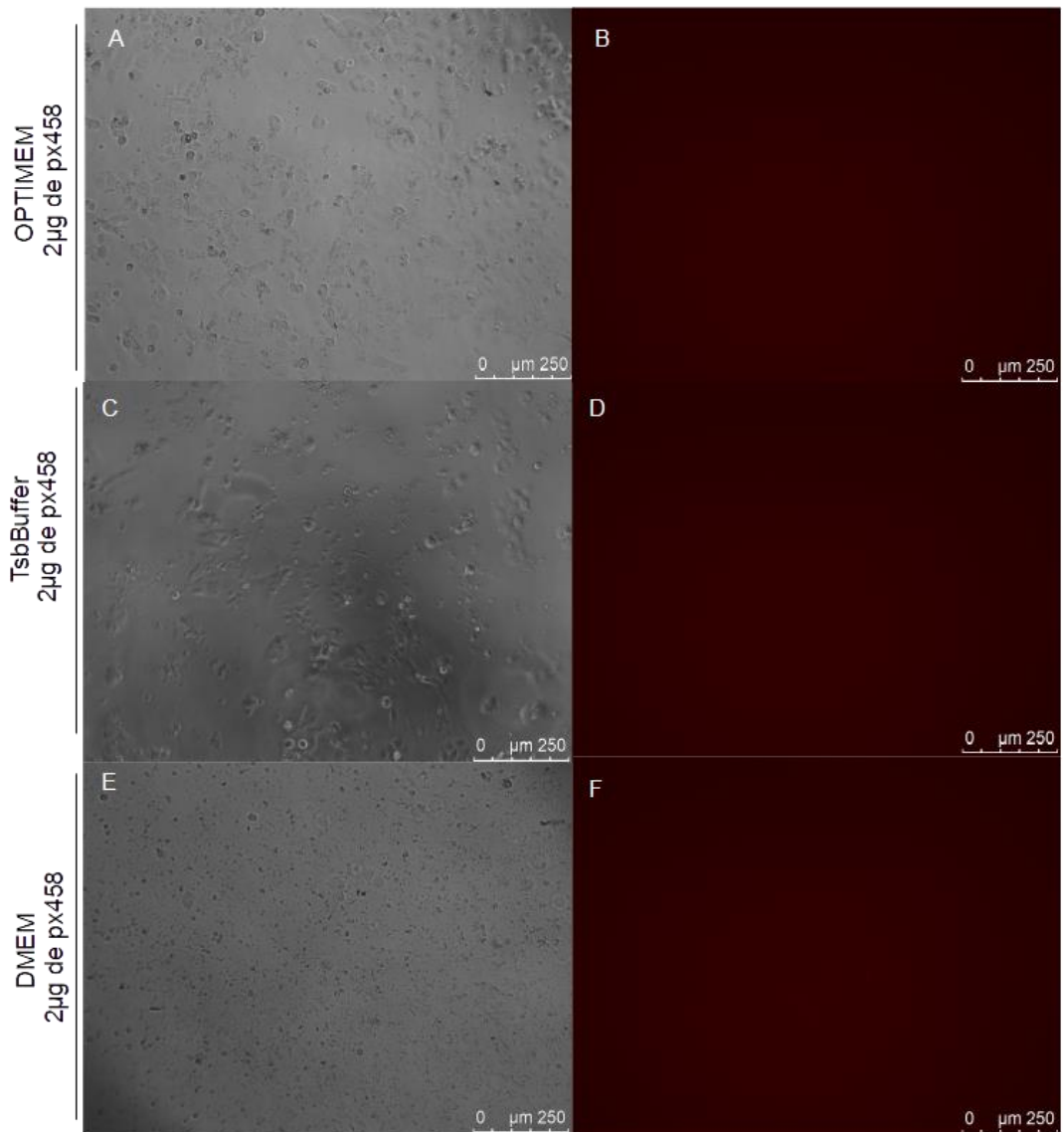


Figura 4.5 – Transfecção por eletroporação usando os tampões OPTIMEM, TsbBuffer e DMEM com 2µg do plasmídeo px458. Em A, C e E – microscopia em contraste de fase mostrando a morfologia celular. Em B, D e F filtro TRITC evidenciando que não há células expressando RFP o que indica baixa eficiência na transfecção. As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência com lente objetiva 20 vezes.

O gráfico comparando a porcentagem de células dos respectivos tampões testados e diferentes concentrações do plasmídeo px458 está apresentado na Figura 4.6, sendo que o resultado mostrou diferença significativa entre o controle positivo – células transfectadas com 2µg/mL do plasmídeo pgmax- com cerca de 14% de células GFP positivas com o tampão OPTIMEM, 11% com o TsbBuffer e menos de 2% com DMEM sem soro e antibióticos, o que foi uma eficiência bem baixa comparado ao trabalho de Maurisse e colaboradores (2010), em que as células de epitélio pulmonar (16HBE14o) foram transfectadas com o mesmo

programa (O-17), 2µg do plasmídeo pmaxGFP (AMAXA Bio- systems) com o tampão V e número de células variando entre  $1 \times 10^6$  e  $2 \times 10^6$  foram obtidas mais de 60% de células positivas para o GFP e viabilidade celular acima de 50%.

Para o plasmídeo px458 a eficiência da transfecção foi ainda mais baixa, não passando de 2% para todas as concentrações e tampões testados. As imagens obtidas por microscopia em contraste de fase evidenciaram debris celulares no sobrenadante especialmente com o tampão DMEM sem soro a antibiótico (Figura 4.5 E), o meio OPTIMEM foi o que mais manteve células aderidas e com morfologia não alterada (Figura 4.5 A).

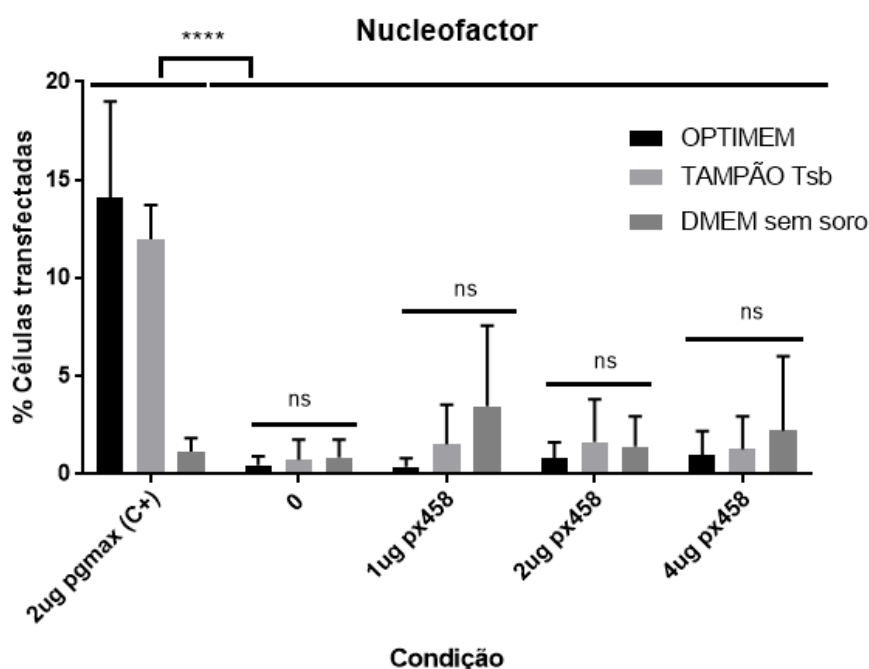


Figura 4.6 – Gráfico comparando as condições de transfecção pelo método de eletroporação. Foram testadas três concentrações de plasmídeo (1µg/mL; 2µg/mL e 4µg/mL) em três tampões de eletroporação diferentes (OPTIMEM, TsbBuffer e DMEM sem soro) com a porcentagem de células expressando fluorescência pelo número de células totais evidenciadas por DAPI. Análise estatística com o Teste Two Way Anova. \*\*\*\*  $p < 0,001$  e ns= não significativo

Os resultados obtidos mostram que o método da eletroporação não foi o mais adequado para esta célula, visto que foi observada morte celular e baixa incorporação do plasmídeo independente do tampão ou concentração do plasmídeo testada, indicando que a intensidade do campo elétrico e tempo do pulso estão inadequados. Dessa maneira, para utilizar o método da eletroporação deve-se melhorar a eficiência, seja testando outros programas

descritos na literatura (X-001, CA137, U23) com intensidades de campo elétrico e tempo de pulsos diferentes, aumentando o número de células iniciais ( $2 \times 10^6$ ) e testando outros tampões. Uma vez resolvido o problema da viabilidade celular pode-se testar diferentes concentrações do plasmídeo px458.

O outro método testado é baseado em compostos lipídicos de natureza catiônica. O mecanismo de ação que faz com que os lipossomos sejam eficientes na entrega de ácidos nucleicos às células eucarióticas é a sua capacidade de interação com a água formando bicamadas lipídicas fechadas (RAMAMOORTH; NARVEKAR, 2015). No caso das formulações catiônicas, a interação ocorre espontaneamente por força iônica, uma vez que o DNA possui carga negativa e se complexa com o lipídio (carga positiva) e permitem a sua associação com a superfície carregada negativamente das células alvo (MAURISSE et al., 2010). A entrega do ácido nucleico no núcleo celular ainda não é totalmente compreendida, mas acredita-se que o complexo seja absorvido pelas células através dos mecanismos de endocitose fagocitose (GHARAATI-FAR et al., 2018). Os lipossomos catiônicos protegem os ácidos nucleicos da degradação enzimática no ambiente extracelular (REES et al., 2017) e tem como vantagem uma baixa citotoxicidade relativa, simplicidade de produção e baixa imunogenicidade (MAURISSE et al., 2010). Um dos reagentes de transfecção baseados em lipídios, disponíveis comercialmente, é a Lipofectamina que é amplamente utilizada em uma variedade de células eucarióticas, especialmente aquelas resistentes à transfecção por outros métodos (GUO et al., 2018). Na literatura, o uso de diferentes reagentes lipídicos para entrega dos componentes do CRISPR foi testado para a entrega de plasmídeos e dentre os testados a Lipofectamina 3000 produziu a maior eficiência de transfecção (13,1%) em células de linhagem de melanoma humano (A375) (ZHANG et al., 2017b).

No experimento de transfecção foram testadas duas concentrações de Lipofectamina 3000, recomendadas pelo fabricante, e três concentrações do plasmídeo px458 (1  $\mu\text{g/mL}$ , 2  $\mu\text{g/mL}$  e 4  $\mu\text{g/mL}$ ), a Figura 4.7 apresenta as imagens de microscopia em contraste de fase e com o filtro TRITC para visualizar a expressão do gene RFP utilizando a menor concentração de Lipofectamina. As imagens de microscopia em contraste de fase mostram que esse método não ocasionou alterações morfológicas significativas e ausência de

debris no sobrenadante em relação ao método de eletroporação (Figura 4.7 A, C e E). Em todas as concentrações de plasmídeo testadas foi observada fluorescência com o filtro TRITC indicando que o plasmídeo foi incorporado pela célula (Figura 4.7 D, F e H). Observa-se que com 2 $\mu$ g de plasmídeo há mais células transfectadas (Figura 4.7 F) em relação às outras duas concentrações, os dados foram corroborado pelo gráfico de quantificação de porcentagem de células transfectadas, calculados da mesma maneira que no método de eletroporação (Figura 4.8).

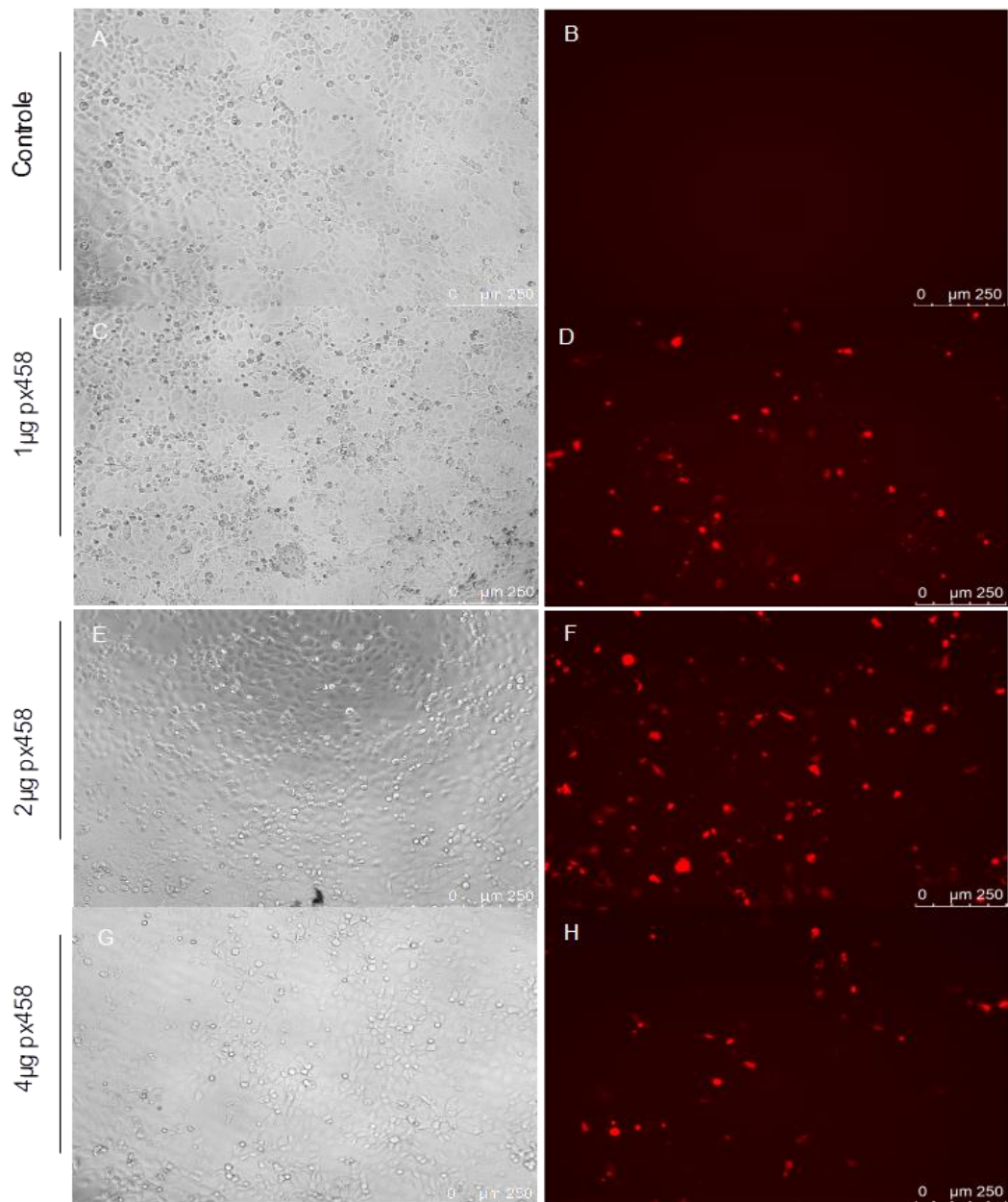


Figura 4.7 –Transfecção com o plasmídeo px458 usando Lipofectamina 3000. Foi utilizada a concentração de 0,15 $\mu$ L de Lipofectamina 3000 por poço e as fotos foram tiradas após 48 horas

de transfecção. São observadas a morfologia em microscopia de contraste de fase e com o filtro TRITC para fluorescência em vermelho. Em (A) microscopia de contraste de fase e (B) filtro TRITC apresentam o controle negativo que não recebeu o plasmídeo. Em C microscopia de contraste de fase e D filtro FITC utilizando 1µg de plasmídeo/mL em meio OPTIMEM, em E contraste de fase e F filtro TRITC com 2µg de plasmídeo/mL em meio OPTIMEM. Por fim, G e H com 4µg de plasmídeo/mL em meio OPTIMEM.

Resultados semelhantes foram obtidos utilizando-se maiores concentrações de Lipofectamina 3000, visto que todas as condições apresentam células que incorporaram o plasmídeo mantendo a viabilidade celular (dados não mostrados). A única concentração em que foram observados mais debris no sobrenadante foi com 4µg de plasmídeo, mas ainda assim era possível visualizar células que receberam o plasmídeo mesmo que em menor quantidade.

A Figura 4.8, apresenta os dados de transfecção com Lipofectamina 3000 comparando duas concentrações diferentes do reagente e plasmídeos. De maneira geral, a eficiência na transfecção variou entre 5 e 10% e foi ligeiramente melhor (9,1%) com 2µg de plasmídeo com a menor concentração de Lipofectamina (0,15µL/poço de 96), para as outras concentrações de plasmídeo não há diferença significativa entre as médias pelo método de Two Way ANOVA com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

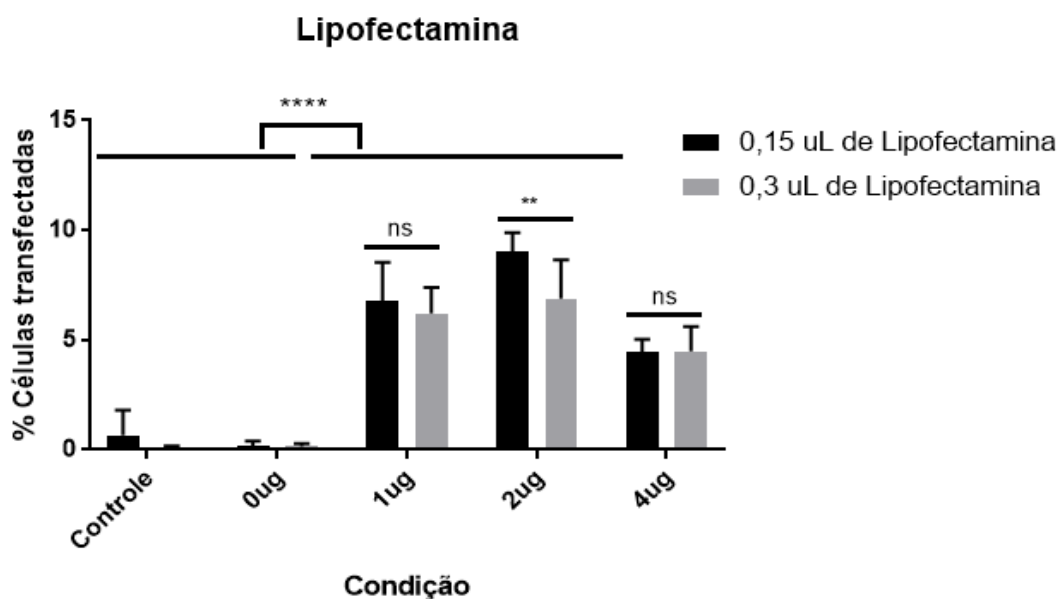


Figura 4.8 - Gráfico comparando as condições de transfecção do plasmídeo px458 com Lipofectamina 3000. Foram comparadas as três concentrações de plasmídeo (1µg/mL; 2µg/mL

e 4µg/mL) em duas concentrações de Lipofectamina 3000 com a porcentagem de células expressando fluorescência (RFP) pelo número de células totais evidenciadas por DAPI. Análise estatística com o Teste Two Way Anova. \*\*  $p < 0,027$ ; ns = não significativo.

Com base nos dados obtidos, o método de transfecção selecionado para os próximos experimentos foi a partir de Lipofectamina 3000 na menor concentração (0,15µL/poço de 96) e 2µg/mL do plasmídeo px458. Os resultados encontrados experimentalmente mostraram que o método de transfecção baseado em Lipofectamina foi mais eficiente do que a eletroporação, quando comparados parâmetros como a internalização do plasmídeo e morfologia celular.

#### **4.1.5 Construção do sgRNA para entrega da Ribonucleoproteína**

Nesta etapa foi mostrada a construção da outra ferramenta de edição que consiste em um complexo ribonucleico (RNP), ou seja, a molécula de RNA é complexada com a proteína purificada, sendo então transfectada para a célula (MEDEIROS et al., 2017). Esta ferramenta é promissora para edição genética aplicada a terapia gênica visto que a expressão da proteína Cas9 é transitória minimizando as possíveis edições fora do alvo no genoma e diminui a toxicidade. A RNP de sgRNA-Cas9 cliva o DNA cromossômico alvo entre 12 e 24 horas e a proteína Cas9 é degradada no período de 24 a 48 horas, um período curto em comparação com os vários dias quando esta é expressa continuamente a partir de um plasmídeo (WANG et al., 2019). As etapas de construção desta ferramenta foram: síntese do DNA dupla-fita, clonagem em vetor, transcrição do RNA *in vitro*, formação do complexo e teste de reconhecimento e clivagem *in vitro*.

#### **4.1.6 Clonagem da sequência no pGEM-T**

O fragmento de DNA dupla-fita, contendo as sequências do promotor T7 do sgRNA e do *tracrRNA* da SaCas9, foi sintetizado comercialmente. Para conseguir grandes quantidades do fragmento este foi inserido em um vetor (plasmídeo) para que possa ser multiplicado na bactéria *E. coli*. Posteriormente, o plasmídeo foi purificado e o fragmento amplificado por PCR com *primers* específicos e purificação do produto. A Figura 4.8 mostra os plasmídeos purificados para cada construção, que foram submetidos a PCR com *primers*

específicos, a fim de verificar a sequência de DNA inserida no *locus* do plasmídeo pGEM-T.

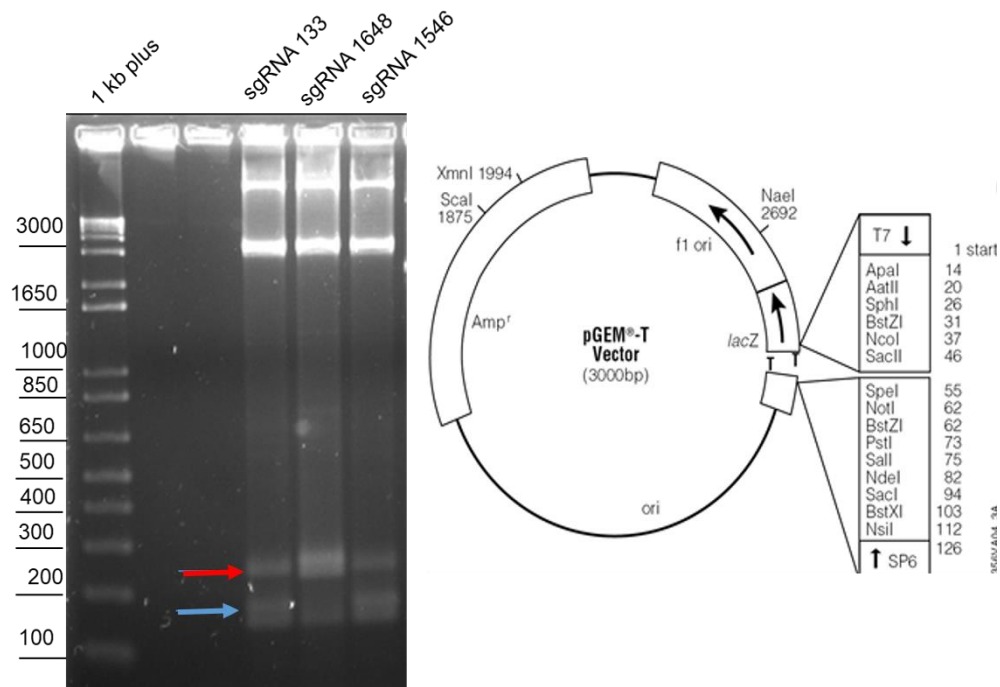


Figura 4.9-Confirmação da inserção da sequência no locus do plasmídeo pGEM-T. Desenho esquemático mostrando a construção do plasmídeo pGEM T Easy utilizado na clonagem. Produto de PCR obtido a partir do plasmídeo pGEM –T Easy e primers específicos para a sequência do sgRNA visualizados em Gel de agarose 2% corado com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain após exposição a luz ultravioleta no e visualizado no fotodocumentador LPIX. A seta azul indica o produto de PCR usando o primer forward T7SaCas9 que se anela na sequência de 179 pb que foi inserida no vetor. A seta vermelha indica a amplificação do fragmento usando a sequência do primer forward do promotor T7 constitutivo do plasmídeo pGEM-T que se anela no fragmento de 179 pb inserido.

Na Figura 4.9 observa-se a inserção da sequência de interesse de tamanho de 179pb representado pela seta azul, porém também é possível visualizar outras bandas no gel: a banda de 220 pares de base (seta vermelha) que corresponde à amplificação da sequência de interesse com a sequência do promotor T7 constitutivo do plasmídeo. Como a sequência do primer T7 SaCas9 há uma sequência de 20 pares de bases em comum com a sequência constitutiva do pGEM-T fez com que amplificasse essa região também o que explica o aparecimento da banda. Com relação a banda próxima aos 3 kb, esta corresponde ao plasmídeo (tamanho esperado) e acima deste um possível contaminante de DNA bacteriano não removido durante a purificação do



plasmídeo pelo kit de MiniPrep. Uma vez com a sequência clonada em vetor, o DNA pode ser transcrito na molécula de RNA.

#### 4.1.7 Transcrição *in vitro* para obtenção do RNA

Para obtenção da molécula de RNA foi realizada a reação de transcrição *in vitro* a partir do promotor T7. Decorrido o tempo de reação, antes de iniciar a purificação do RNA, foi adicionada água e solução de acetato para parar a reação, 2µL foi aplicado em gel de agarose 2% e a molécula de RNA, de tamanho entre 100 e 200 pares de bases, podem ser visualizados na Figura 4.10 A (setas azuis) conforme o esperado. Além disso o RNA foi analisado pelo equipamento Bioanalyzer Agilent para confirmação do tamanho e concentração da amostra na Figura 4.10 B. Cada sgRNA aparece como um pico na região de 200 pb (setas azuis), o pico na região de 25 pb representa o marcador (*Ladder*) utilizado como referência do tamanho. Nota-se que há picos de menor tamanho, indicativos de uma possível degradação.

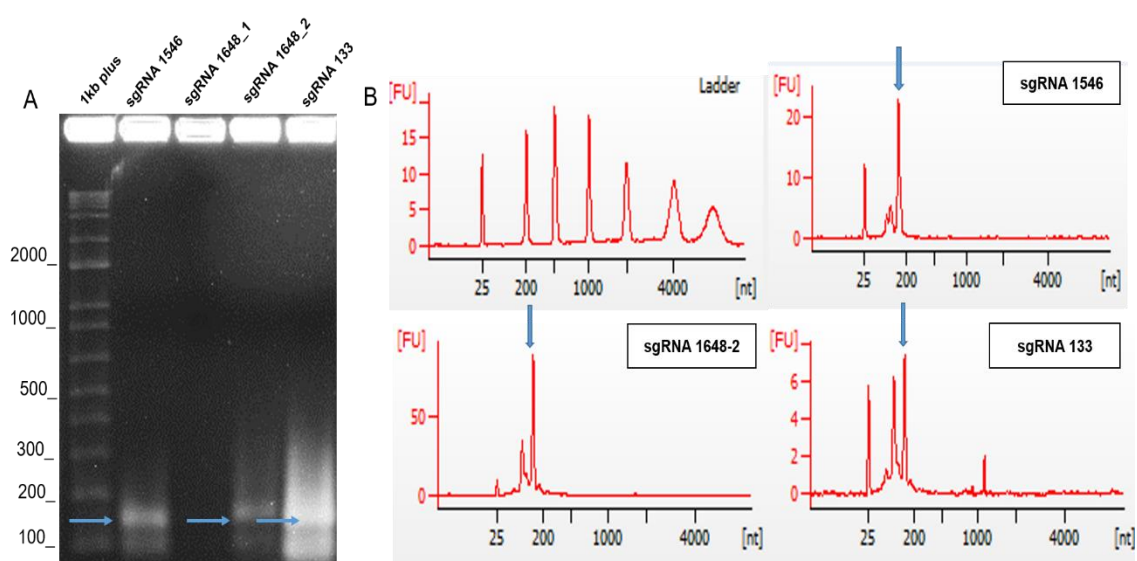


Figura 4.10 Confirmação da purificação da molécula de RNA que contém a sequência do sgRNA e tracrRNA para ancoramento da SaCas9. (A) Visualização do RNA em gel de agarose 2% após a adição da solução de acetato. O marcador 1kb plus foi usado como referência de tamanho e o RNA foi corado com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain e exposição a luz ultravioleta visualizado no fotodocumentador *LPIX*. (B) Histogramas resultantes da análise de RNA pelo equipamento Bioanalyzer Agilent, sendo Ladder a referência em tamanho e os respectivos picos para cada amostra de RNA (1546, 133 e 1648-2). Para o sgRNA 1648 foram testadas duas concentrações

de DNA inicial e por isto é apresentado os índices 1648\_1 (referente a 1 ng/μL de DNA inicial) e 1648\_2 (referente a 2 ng/μL de DNA inicial).

Após a purificação do sgRNA através da precipitação com etanol, a concentração do eluído foi medida com o espectrofotômetro e corroborada pelo equipamento Bioanalyzer Agilent RNA conforme apresentado na Tabela 4.2.

sgRNA	Concentração de DNA inicial (ng/μL)	Rendimento de RNA purificado (μg/μL)	A260/280	A260/230
1546_SaCas9	1	3,2	2,10	2,03
1648_1SaCas9	1	1,8	1,62	1,11
1648_2SaCas9	2	3,5	1,90	1,80
133_SaCas9	2	6,5	2,05	2,13

Tabela 4.2 Rendimento da reação de transcrição in vitro após a purificação do RNA. As medidas da concentração foram feitas por espectrofotometria no Nanodrop, bem como a indicação dos fatores de pureza A260/280 e A260/230.

Os dados da Tabela 4.2 evidenciam que a concentração de DNA inicial influencia no rendimento final em RNA, mas que este rendimento diferiu para cada sequência de sgRNA o que não era esperado visto que possuem 21 nucleotídeos distintos apenas. O rendimento obtido pode ser relacionado com a intensidade da banda no gel de agarose (Figura 4.10 A), sendo que o sgRNA 1546 e sgRNA 1648\_2 apresentam intensidades e concentrações semelhantes e o sgRNA 133 que apresentou o maior rendimento (6,5 μg/ μL) também apresentou maior intensidade de banda. O sgRNA 1648 a partir de 1μg de DNA (sgRNA1648\_1) obteve menor rendimento (1,8μg/μL) e não foi possível visualizar no gel, provavelmente pela sua baixa concentração.

Como os ácidos nucleicos absorvem na faixa de 260nm, as relações da absorbância em 260 nm e 230 nm (260/230) são indicativos de pureza; para o RNA esses valores estão geralmente na faixa entre 1,8 e 2,2, sendo que valores abaixo desta faixa apresentam contaminações com solventes (fenol ou guanidina) do processo de purificação do RNA. A absorbância em 280 nm é característico de proteínas, portanto, a relação (260/280) é indicativo de contaminantes proteicos ou solventes como fenol. Pelos valores obtidos, o sgRNA 1648\_1 apresentou as piores relações tanto em rendimento quanto em pureza indicando algum problema no processo de purificação do RNA.

#### 4.1.8 Reação de clivagem *in vitro*

O experimento de clivagem *in vitro* tem como objetivo mostrar se o sgRNA com a proteína SaCas9 purificada são capazes de reconhecer e clivar o DNA (substrato). Para este fim, podem ser utilizadas diferentes proporções do complexo para o substrato, mantendo uma proporção molar. Como o gene CFTR inteiro é muito extenso (190 kb) e para o experimento se faz necessário a visualização dos fragmentos obtidos em gel de agarose, um fragmento de 906pb do gene CFTR foi amplificado por PCR com *primers* específicos, servindo como substrato da reação. Desta maneira, a Tabela 4.3 apresenta o tamanho dos fragmentos esperados após a clivagem do substrato por cada sgRNA.

sgRNA	Tamanhos esperados após clivagem
1546	300 e 604 pb
1648	400 e 506 pb
133	329 e 577 pb

Tabela 4.3 Fragmentos esperados após clivagem do DNA (substrato) de 906 pb pela enzima SaCas9.

Após o fragmento ser purificado, de forma a observar uma única banda no gel de agarose, foram testadas diferentes proporções (molar) do complexo (sgRNA :SaCas9: substrato) durante 3 horas de reação a 37°C. A Figura 4.11 mostra o produto da reação de clivagem *in vitro* aplicada em gel de agarose 2% com diferentes proporções molares A (5:5:1), B(10:10:1) e C (20:20:1).

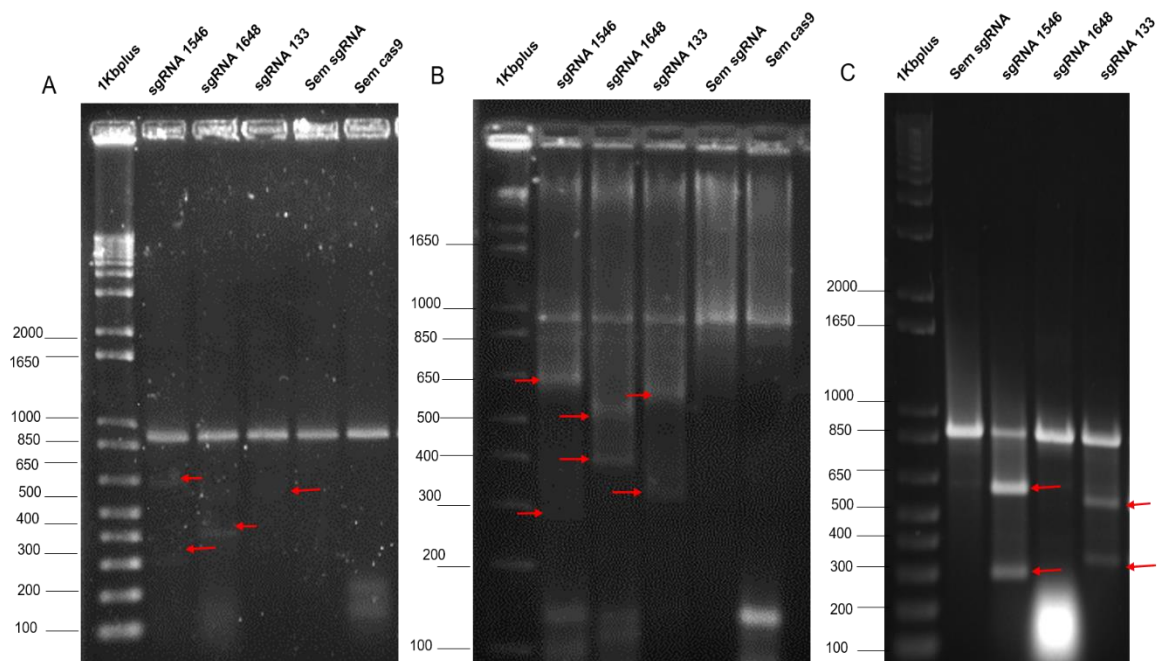


Figura 4.11 Reação de clivagem *in vitro* usando fragmento de 906 pb do gene CFTR. O produto da reação é visualizado em gel de agarose 2% corado com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain após exposição a luz ultravioleta, visualizado no fotodocumentador LPIX. As setas vermelhas representam os fragmentos do tamanho esperado que foram gerados. (A) Reação de clivagem na proporção de 5:5:1 (sgRNA: proteína: substrato), respectivamente, com 350ng de substrato inicial; (B) reação de clivagem na proporção de 10:10:1 (sgRNA: proteína: substrato), com 200ng de substrato inicial e (C) reação de clivagem na proporção 20:20:1 (sgRNA: proteína: substrato), com 200ng de substrato inicial.

Conforme visualizado no gel de agarose, foram gerados os fragmentos esperados para cada um dos sgRNA indicando que o complexo é capaz de reconhecer e clivar o fragmento do gene CFTR (substrato) *in vitro*. Na Figura 4.11A não foi possível ver a diminuição na intensidade da banda do substrato, mas observa-se clivagem pela presença das bandas no gel de tamanho específico para todos os sgRNAs, embora em baixa intensidade. O tempo de reação foi de 3 horas e quantidade de DNA para o substrato de 350 ng, seguindo as proporções de 5:5:1 (sgRNA: proteína: substrato). As reações “sem sgRNA” (somente a SaCas9) e “sem a proteína SaCas9” não apresentaram fragmentos garantindo o controle do experimento. Na condição sem Cas9, para todas as proporções analisadas, foi observado um fragmento entre 100 pb e 200pb, que provavelmente corresponde ao sgRNA.

A Figura 4.11 B apresenta os resultados de clivagem *in vitro* para todos os sgRNAs na proporção de (10:10:1) e 200 ng de DNA inicial. A Figura 4.11 C apresenta o resultado utilizando a proporção de (20:20:1), também com 200ng de DNA inicial. Em ambas proporções se observa que os fragmentos gerados são dos tamanhos esperados (representados pelas setas vermelhas) para os sgRNAs, indicando que o complexo é capaz de reconhecer e clivar o DNA alvo. Na proporção de (20:20:1) observa-se que os complexos dos sgRNA1546 e sgRNA133 apresentam maior atividade, visualizadas pela intensidade das bandas dos fragmentos gerados. Para esta proporção o sgRNA1648 não apresentou clivagem significativa, sendo visualizada, claramente, uma banda em torno de 200pb, que possivelmente corresponde ao RNA.

A quantificação relativa da intensidade das bandas foi realizada com auxílio do software ImageJ (U. S. National Institutes of Health, USA) estabelecendo como 100% a média da intensidade obtida para a condição “sem

sgRNA” e relacionando com as condições tratadas com os sgRNAs. Para a proporção 5:5:1 (Figura 4.11 A) não foi observada diferença na intensidade para todas as condições, no entanto a proporção 10:10:1 (Figura 4.11 B) teve eficiência de clivagem de 31% para o sgRNA 1546, 36% para o sgRNA 1648 e 32% para o sgRNA 133. E por fim, a proporção de 20:20:1 (Figura 4.11 C) teve eficiência da clivagem de 35% para o sgRNA 1546, 0% para o sgRNA 1648 e 21% para o sgRNA 133. Os dados referentes podem ser visualizados no gráfico da Figura 4.12.

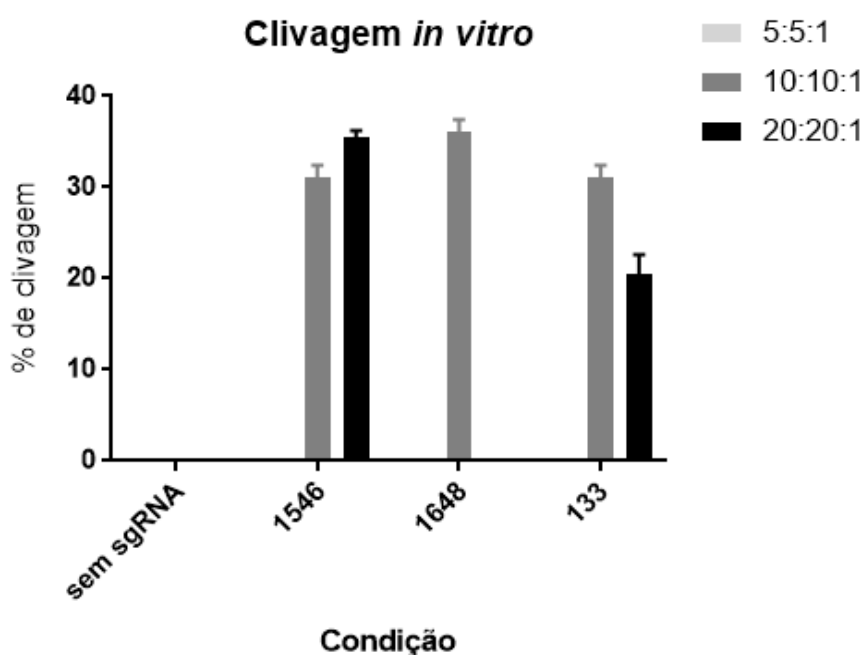


Figura 4.12 Porcentagem de clivagem do substrato nas diferentes proporções testadas: 5:5:1; 10:10:1 e 20:20:1. A porcentagem relativa foi calculada com base na intensidade da banda referente ao substrato (100%) com uso do software ImageJ. Experimentos realizados em duplicata.

De maneira geral, o experimento mostrou que o complexo SaCas9:sgRNA está funcional com capacidade de reconhecer o substrato especificamente e clivar, indicando assim que a ferramenta da ribonucleoproteína está funcionando *in vitro*.

#### 4.1.9 Transfecção do Complexo Ribonucleoproteico

O método de transfecção para o plasmídeo, demonstrado anteriormente, foi selecionado com base na maior porcentagem de células expressando o gene da proteína vermelha fluorescente. No entanto, a eficiência na entrega da ribonucleoproteína não é possível de quantificação pois não há nenhum gene repórter fusionado a um dos elementos do complexo. Como a proteína SaCas9 possui 3 histidinas, utilizadas na sua purificação, o anticorpo anti-histidina foi testado (dados não mostrados) em técnica de imunofluorescência indireta, porém a marcação foi semelhante entre o controle e amostra transfectada. Provavelmente a marcação do controle foi devido a especificidade do anticorpo (histidina) a outras proteínas presente na célula ou talvez pela quantidade de SaCas9 indetectável pela técnica. Dessa forma, as condições de transfecção do completo ribonucleoproteico foram baseadas em dados retirados da literatura conforme apresentado na Tabela 4.4:

Referência	Quantidade de Cas9/sgRNA (µg)	Quantidade de células	Método de Transfecção	Eficiência (Indels)
(LIANG et al., 2015a)	500ng Cas9/120 ng sgRNA	1-2x10 <sup>5</sup>	Lipofectamina 3000	51% HEK293 e 5% célula-tronco
(VAIDYANATHAN et al., 2020)	6 µg Cas9/3,2 µg sgRNA	1 x10 <sup>5</sup> (HBECs)	Eletroporação (CA-137) Lonza 4D	15%
(WANG et al., 2019)	1 µg cas9 e 0,33µg de sgRNA	8x10 <sup>4</sup> (HEK293)	Lipofectamina 2000	12,7% a 31,4%
(RUAN et al., 2019)	2 µg Cas9 e 0,67µg de sgRNA	3x10 <sup>5</sup> iPSC	Lipofectamina 2000	15%
(RUAN et al., 2019)	10 µg Cas9 e 3,3 µg de sgRNA	2,5x10 <sup>6</sup> iPSC	Eletroporação 620 V, 30 ms TX-1500A LE	5% a 88%
(LATTANZI et al., 2019)	5 µg Cas9 e 2,5 µg sgRNA	2x10 <sup>5</sup> (HSPCs)	Eletroporação (CA137)	8,1% a 20%

Tabela 4.4 Resumo das condições de transfecção do complexo RNP. Dados da literatura com as concentrações do complexo (Cas9 e sgRNA) com os métodos de transfecção utilizados em diferentes tipos celulares: HBECs – células de linhagem do epitélio brônquico, HEK293 – células da linhagem de rim de embrião humano, iPSC- células-tronco pluripotente induzidas, HSPCs-

células progenitoras hematopoiéticas. A eficiência é dada pela medida da porcentagem de eventos de inserção e deleção da região alvo (indels).

Para este trabalho, com células de linhagem de epitélio pulmonar, foram selecionadas as concentrações obtidas no trabalho de Vaidyanathan e colaboradores (2020), visto que foi transfectada uma linhagem celular de epitélio brônquico (HBECs) que se assemelha ao tipo de células que será utilizado.

#### 4.2 Etapa 2 – Aumento do Reparo Dirigido por Homologia (HDR)

Após o reconhecimento do *locus* específico pelo sgRNA e a clivagem da dupla-fita pela proteína Cas9, a próxima etapa é a ativação da maquinaria de reparo do DNA que é realizado pela própria célula. O mecanismo de reparo do DNA pode ser via junção das extremidades não-homólogas (NHEJ) ou reparo dirigido por homologia (HDR), sendo a ocorrência por NHEJ a mais frequente (YIANGOU et al., 2019). Para corrigir a mutação F508del é necessário fornecer uma sequência de DNA doador para a que ocorra o HDR. Em geral, a eficiência do HDR varia de 0,5 % (ROCHE et al., 2018; WALKER, 2011) a 30% (YEH; RICHARDSON; CORN, 2019). Desta forma, as estratégias que podem ser aplicadas para tentar melhorar a ocorrência deste mecanismo são: (1) fusão do DNA doador com a proteína Cas9 facilitando a proximidade física para ocorrência do reparo (YEH; RICHARDSON; CORN, 2019); (2) inibição de proteínas e fatores da via NHEJ com uso de drogas (RIESENBERG; MARICIC, 2018) e (3) sincronização do ciclo celular nas fases S/G2 (ROCHE et al., 2018). A Tabela 4.5 apresenta alguns compostos químicos descritos na literatura testados para aumentar a eficiência do mecanismo de reparo HDR. Estas drogas atuam como inibidores da via NHEJ ou como sincronizadoras do ciclo celular em determinadas fases.

Molécula	Atuação	Célula	Referência
<b>Nocodazol</b>	Sincronização do ciclo celular G2/M	HEK293T hESC	(YANG et al., 2016; YIANGOU et al., 2019; ZHANG et al., 2017a)
<b>SCr7</b>	Inibidor DNA ligase IV (NHEJ)	A549, HEK293, MCF-7	(HU et al., 2018; MARUYAMA et al., 2015; YANG et al., 2016)
<b>Brefeldin A</b>	Inibidor NHEJ	iPSC	(ZHANG et al., 2017a)
<b>L755507</b>	Inibidor NHEJ	iPSC, fibroblasto	(ZHANG et al., 2017a)
<b>RS1</b>	Inibidor NHEJ	HEK293 iPSC	(SONG et al., 2016; ZHANG et al., 2017a)

<b>Afidicolina</b>	Sincronização do ciclo celular S	HEK293	(LIN et al., 2014)
--------------------	----------------------------------	--------	--------------------

Tabela 4.5 Moléculas descritas na literatura que aumentam a frequência do reparo dirigido por homologia (HDR) em diferentes células.

Com base nas moléculas descritas na literatura, a inibição da via de reparo NHEJ apresentou resultados promissores quanto ao aumento do HDR. A droga SCR7 a 0,01  $\mu$ M promoveu uma inserção precisa de 21 pb nas células de linhagem epitelial humana (A549) 3 vezes maior que sem a droga, porém é relatado que a droga pode induzir a célula a entrar em apoptose (MARUYAMA et al., 2015). Com as drogas RS1, L755507 e brefeldina A o aumento do HDR foi inexpressivo, sendo muito dependente da linhagem celular. OS resultados mostraram baixa eficiência em células-tronco pluripotentes humanas e células primárias (ZHANG et al., 2017a) e toxicidade em linhagens celulares de carcinoma e embriões murinos (YANG et al., 2016).

A sincronização do ciclo celular com a droga nocodazol, antes da entrega de plasmídeo expressando a Cas9 e sgRNA, aumentou a eficiência em torno de 10% do HDR para células-tronco embrionárias (ZHANG et al., 2017a). Já a sincronização das células HEK293 na fase S ou G2/M, aumenta a eficiência do HDR de 26% para 38%. Por esta razão, drogas que atuam sincronizando o ciclo celular foram testadas na linhagem CFBE: o nocodazol foi testado para as fases G2/M e a hidroxiureia para a fase S já que são as fases em que a frequência deste mecanismo de reparo é maior.

A hidroxiureia é utilizada como droga antineoplásica, esta apresenta citotoxicidade dependendo da concentração usada, da duração da exposição e da sensibilidade do tipo de célula. Em altas concentrações (>10mM) ou com exposição prolongada em doses mais baixas, a droga é citotóxica para várias células de mamíferos, como células de hamster chinês (CHO), células de linfoma de camundongo, células tumorais de Ehrlich e linfócitos humanos (SINGH; XU, 2016).

O nocodazol é um agente sintético de ligação à tubulina e também apresenta atividade antineoplásica. Esta droga se liga a tubulina beta impedindo a polimerização de microtúbulos o que evita a mitose, mantendo as células nas fases G2/M e induzindo apoptose nas células tumorais (PUBCHEM, 2020). Um estudo com 15 linhagens de células submetidas a exposição ao nocodazol



mostrou que algumas células tiveram a divisão celular suprimida durante a exposição, e após a retirada da droga continuaram o ciclo celular. Além disso, muitas células apresentaram morte durante a fase de interfase após a retirada da droga, fazendo com que a resposta celular fosse correlacionada com a concentração da droga utilizada e tempo de exposição fazendo com que concentrações maiores aumentassem o efeito de apoptose (BATES; EASTMAN, 2017).

#### 4.2.1 Sincronização do Ciclo Celular

Com o objetivo de determinar a concentração de cada droga a ser utilizada na cultura celular da linhagem CFBE, que não seja tóxica para a célula, foi realizado um ensaio de citotoxicidade. Este ensaio permite a medida da viabilidade celular relativa através da incorporação e retenção do corante vermelho neutro ao lisossomo das células viáveis. Desta forma, a medida da absorbância em 540nm é diretamente proporcional a viabilidade celular (SIQUEIRA, 2016). Os resultados obtidos foram plotados em gráficos de barras na Figura 4.13 e aplicado o teste estatístico de *Dunnet*, a fim de se determinar a maior dose de cada droga que não altera a viabilidade celular em relação ao controle sem tratamento.

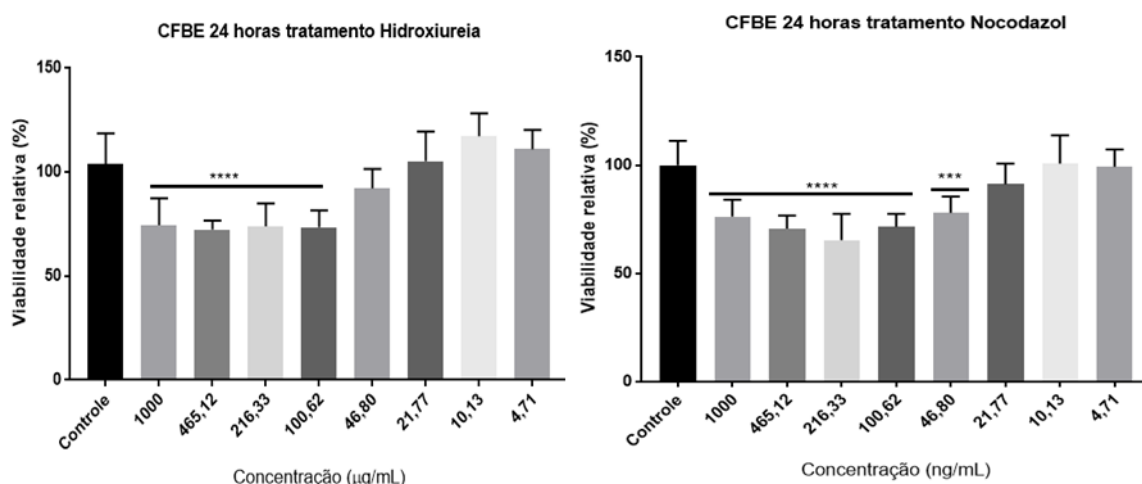


Figura 4.13 Ensaio de viabilidade celular após 24 horas de exposição às drogas. Viabilidade relativa obtida pela medida da absorbância em 540nm com as diferentes concentrações das drogas testadas (hidroxiureia e nocodazol) após 24 de exposição. A absorbância do controle foi

relacionada com 100% de viabilidade. Comparação das médias pelo teste estatístico ANOVA Dunnet test  $p > 0.05$ .

Desta forma, determinou-se que a concentração máxima de hidroximetilureia a ser testada no ensaio de ciclo celular fica em torno de 46,80  $\mu\text{g/mL}$  e para o nocodazol uma concentração máxima de 21  $\text{ng/mL}$ . Concentrações maiores poderiam ser usadas, porém nesta etapa o objetivo seria apenas sincronizar as células no fim da fase S e G2 mantendo a maior viabilidade possível, uma vez que após a retirada da droga as células são transfectadas.

Com as concentrações das drogas definidas, foi analisado o ciclo celular com base na incorporação de iodeto de propídeo (PI) que é um reagente com a propriedade de se intercalar ao DNA em pequenas sequências de bases nucleotídicas, e de emissão no comprimento de onda de 617nm quando excitado por laser. A solução utilizada no ensaio contém um detergente para a permeabilização da membrana e a enzima ribonuclease para degradação do RNA, mantendo a marcação específica para DNA. A análise é baseada na quantificação de DNA no interior das células por citômetro de fluxo. Assim, células na fase G2/M do ciclo tem o dobro de DNA do que as células na fase G0/G1, representadas pela intensidade de fluorescência em escala linear (CARVALHO, RIBEIRO, NOGUEIRA, 2010). Com a seleção das *gates* propostas para o controle, a mesma análise foi realizada para as células com tratamento e a porcentagem das células em cada fase do ciclo celular com o respectivo tempo de recuperação está expressa na Figura 4.14.

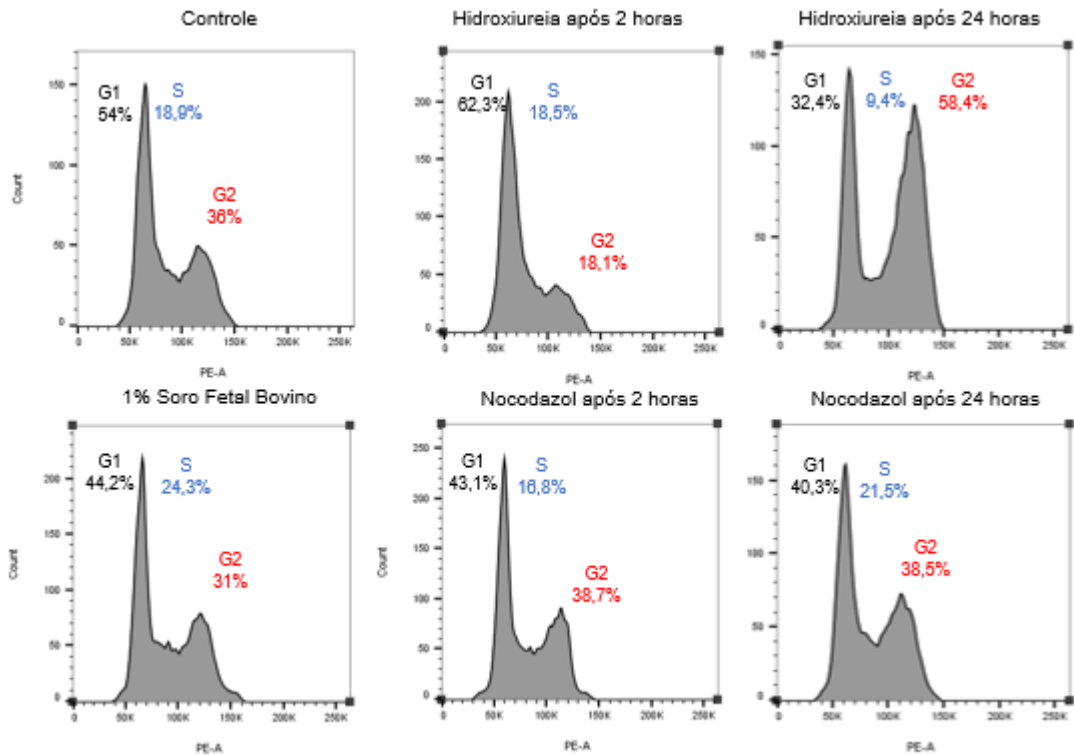


Figura 4.14– Média da Porcentagem relativa da quantidade de células em cada fase do ciclo celular (controle) e tratados com nocodazol e hidroxiureia após 2 e 24 horas de recuperação. O eixo y do gráfico representa a contagem dos eventos (nº de células) e o eixo x a intensidade de fluorescência no canal de 570nm (PE-A).

Os dados presentes na Figura 4.14 foram plotados em gráfico de barras Figura 4.15, para duas horas de recuperação, e na Figura 4.16 para 24 horas de recuperação. Após duas horas de recuperação, a população de células tratadas com hidroxiureia, apresentou mais de 60% de células na fase G1 e 19% na fase G2 do ciclo celular. Decorridas 24 horas o cenário muda: cerca de 33% das células estão na fase G1 e cerca de 58,4% na fase G2 indicando a progressão das células no ciclo celular. Como o mecanismo de ação da droga atua inibindo enzima ribonucleotídeo redutase e a produção de dNTP (YIANGOU et al., 2019) é levado o acúmulo das células no final na fase S do ciclo celular. Logo, a hidroxiureia foi selecionada para sincronização na fase G2 após 24 horas de recuperação para verificação da influência no HDR das células.

Em contrapartida, a droga nocodazol na concentração utilizada manteve o perfil do ciclo celular muito semelhante ao controle. A maioria da população apresentou porcentagem semelhante nas fases G1 e G2, cerca de 40%, tanto em 2 horas quanto em 24 horas de recuperação.

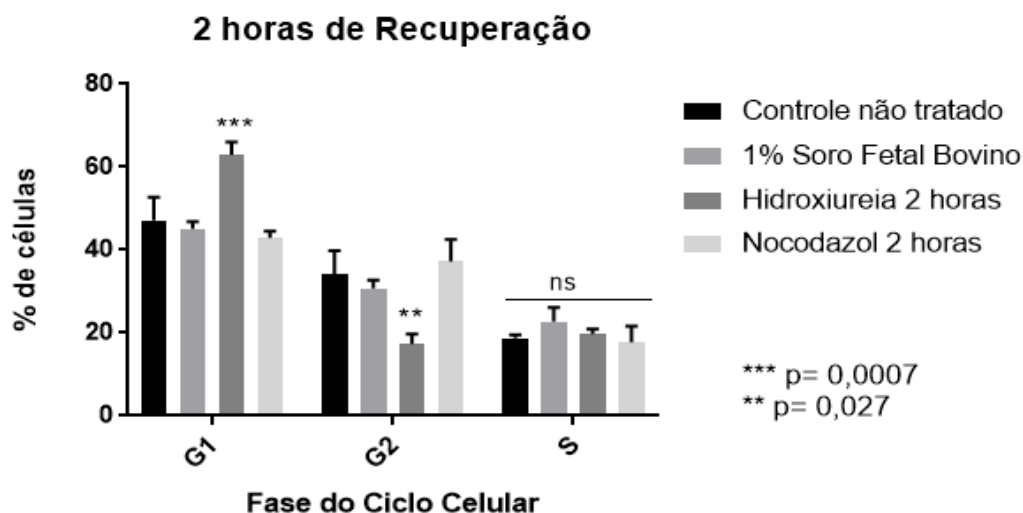


Figura 4.15- Porcentagem de células CFBE em cada fase do ciclo celular após 2 horas de recuperação. Ensaio de ciclo celular com iodeto de propídeo após de retirada da drogas e 2 horas de recuperação em meio de cultura. As condições testadas foram: células não tratadas, 1% de soro fetal bovino, hidroxiureia e nocodazol. ANOVA One Way \*\*\* p=0,007; \*\*p= 0,027

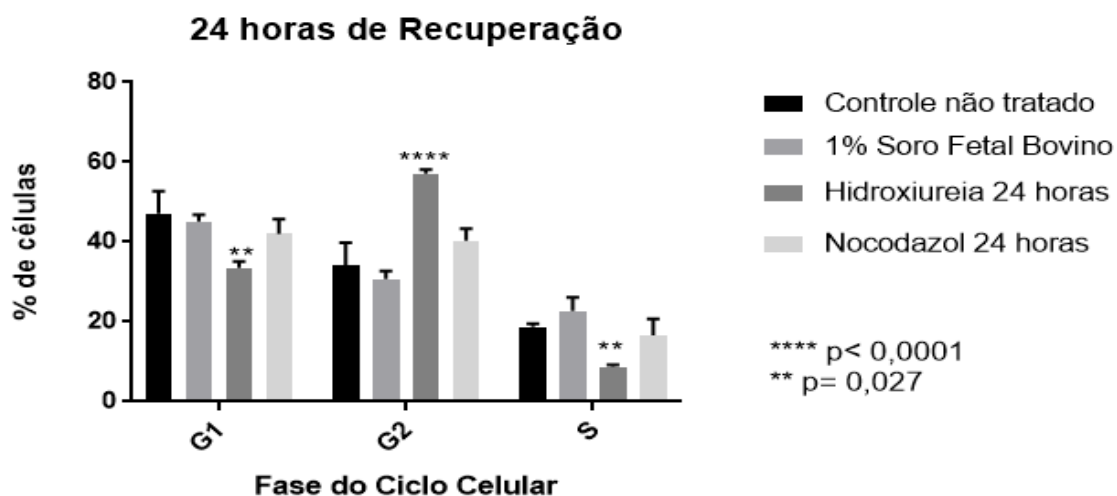


Figura 4.16 - Porcentagem de células CFBE em cada fase do ciclo celular após 24 horas de recuperação. Ensaio de ciclo celular com iodeto propídeo após de retirada das drogas e 24 horas de recuperação em meio de cultura. As condições testadas foram: células não tratadas, 1% de soro fetal bovino, hidroxiureia e nocodazol. ANOVA One Way \*\*\*\* p<0,0001; \*\*p< 0,027

Os dados obtidos experimentalmente, nas células da linhagem CFBE, revelaram que a concentração das drogas utilizadas para sincronização do ciclo celular foi bem menor do que o descrito na literatura, o que explicaria porque as porcentagens de células sincronizadas variou de 40% a 60% na fase G<sub>2</sub>.

### **4.3 Etapa 3 – Detecção selvagem e mutante**

#### **4.3.1 Padronização do teste de detecção (imunofluorescência)**

As células epiteliais brônquicas de fibrose cística (CFBE) foram produzidas por células imortalizadas do brônquio de um paciente com fibrose cística homocigoto para a mutação F508del (GRUENERT et al., 2004). As células CFBE são usadas como modelos de estudo da função do canal, durante a triagem inicial no desenvolvimento de fármacos e moduladores para o tratamento da fibrose cística (LOPES-PACHECO, 2016).

A estratégia inicial, proposta para mensurar os melhores parâmetros para aplicação do CRISPR, seria o reconhecimento do canal CFTR por um anticorpo específico, de forma que células selvagens e mutantes apresentem diferentes perfis de marcação. A mutação F508del leva ao dobramento incorreto da proteína CFTR e sua retenção no retículo endoplasmático (ER) para degradação prematura. Desta maneira, esperava-se que na célula mutante, a marcação com o anticorpo se apresentasse na região perinuclear, mas para a célula CFBE selvagem, a marcação seria mais citoplasmática ou na região apical da membrana celular.

O perfil de marcação, das células mutante e selvagem, está apresentado na Figura 4.17. As imagens de microscopia de fluorescência revelam que não há diferença no perfil de marcação das células CFBE selvagem e mutante. Para verificar se há diferença na quantidade de células marcadas e na intensidade da fluorescência entre as duas populações de células foi utilizado Harmony software (PerkinElmer) do equipamento *high content image* (Operetta CLS). A comparação da intensidade de fluorescência entre as duas populações não apresentou diferença significativa além de que ambas mostravam mais de 98% de células marcadas e sem um perfil específico de marcação.

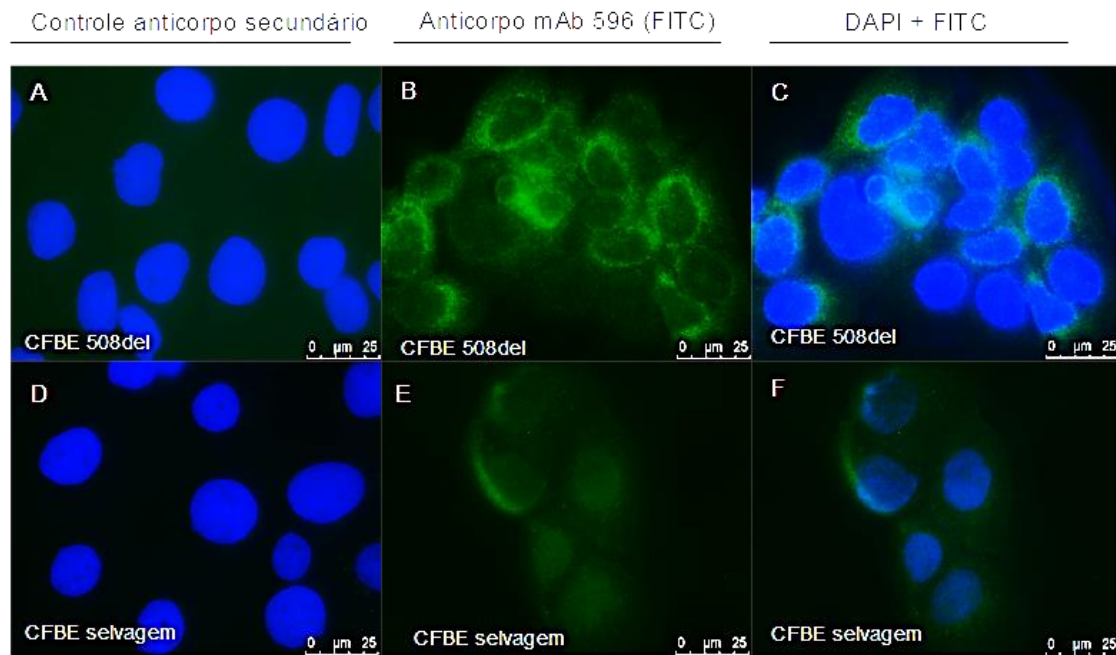


Figura 4.17- Marcação do canal CFTR. A marcação foi realizada pelo anticorpo primário mAb 596 e secundário conjugado ao fluoróforo Alexa 488, núcleos foram marcados com DAPI (A) controle do anticorpo secundário (Alexa 488) nas células F508del (B) perfil de marcação do canal CFTR no filtro FITC (C) núcleos marcados com DAPI (azul) e canal CFTR em verde pelo filtro FITC (D) controle do anticorpo secundário em células selvagem (E) perfil de marcação do canal CFTR no filtro FITC (F) núcleos marcados com DAPI (azul) e canal CFTR em verde pelo filtro FITC. Experimento realizado em triplicata com análise de 25 fotos por réplica. Intensidade de fluorescência comparada através do teste Tukey ANOVA One Way  $p < 0,05$ .

Como não era possível estabelecer um perfil de marcação pelo anticorpo nem mesmo nas célula selvagem, foram testados outros métodos de fixação e permeabilização a fim de melhorar o reconhecimento do anticorpo conforme apresentado na Figura 4.18. De maneira geral, mesmo testando dois diferentes fixadores com tempos de fixação e permeabilização (10, 15, 20 e 30 minutos) não foi possível evidenciar claramente a marcação do CFTR com o anticorpo na célula selvagem para nenhum dos métodos testados. Aparentemente o uso de metanol e permeabilização com triton X100 0,3% apresentou maior intensidade na fluorescência, embora esta diferença não foi estatisticamente significativa.

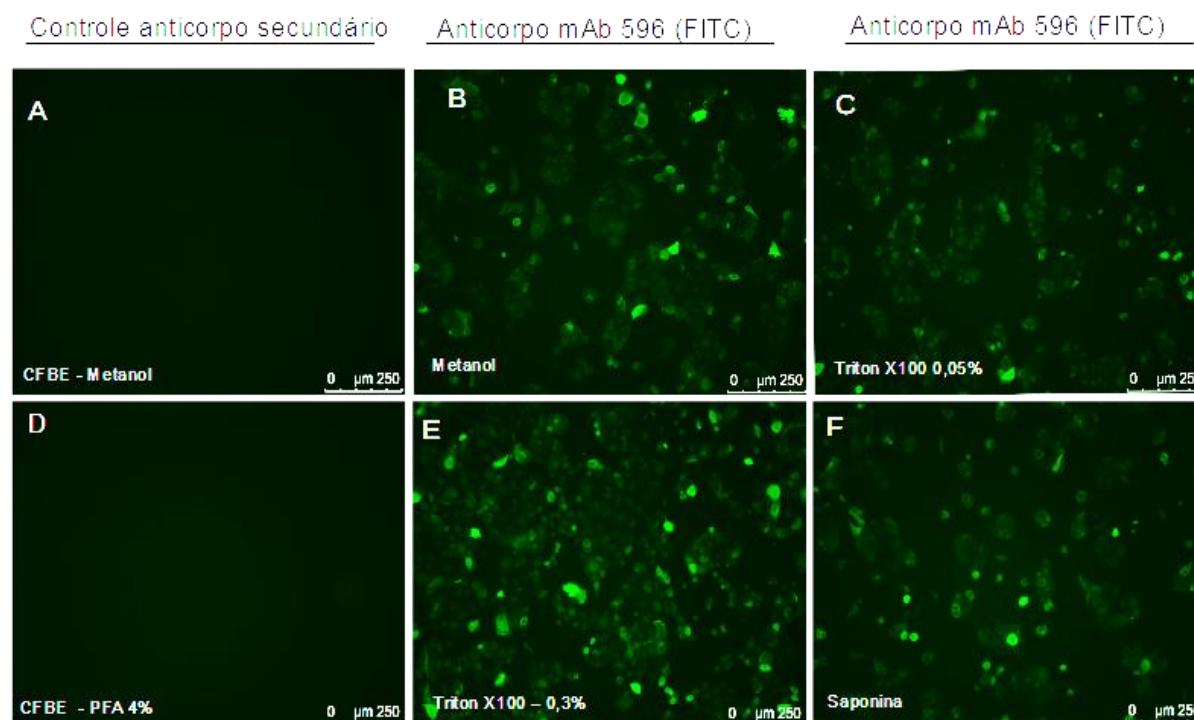


Figura 4.18– Imunofluorescência com anticorpo mAb 596 para marcação do CFTR com diferentes métodos de fixação e permeabilização: (A) Controle do anticorpo secundário com a fixação com metanol durante 20 minutos; (B) Canal CFTR marcado com anticorpo mAb 596 (1:250) após a fixação com metanol durante 20 minutos; (C) Canal CFTR marcado com anticorpo mAb 596 (1:250) após a fixação com paraformaldeído e permeabilização com triton X100; (D) controle do anticorpo secundário com a fixação com PFA 4%, (E) Canal CFTR marcado com anticorpo mAb 596 (1:250) após fixação com PFA 4% e permeabilização com 0,3% com triton x100 e (F) Canal CFTR marcado com anticorpo mAb 596 (1:250) após fixação com PFA 4% e permeabilização com saponina.

Apesar dos diferentes protocolos para otimizar a marcação do CFTR nas células CFBE selvagem, buscou-se saber se o anticorpo mAb 596 realmente reconhece a proteína CFTR. Para este fim foram selecionadas outras células, já descritas na literatura, que expressam o canal CFTR.

No trabalho de Riordan et al., (1990) foi apresentada a marcação do canal CFTR, em células endoteliais humanas isoladas da veia umbilical (HUVEC), e o autor propôs que o método de fixação variava de acordo com a região da proteína que o anticorpo reconheceria. Tal qual o anticorpo mAb 596 reconhece o domínio intracelular NBD2 na região carboxiterminal da proteína CFTR, o perfil da marcação seria mais citoplasmático. Para verificar se o anticorpo mAb 596 estava reconhecendo o canal CFTR, foi testado o método de

fixação com metanol e pós-fixação com paraformaldeído 4% utilizando células HUVEC como controle positivo, células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e células CFBE 508del conforme apresentado na Figura 4.19.

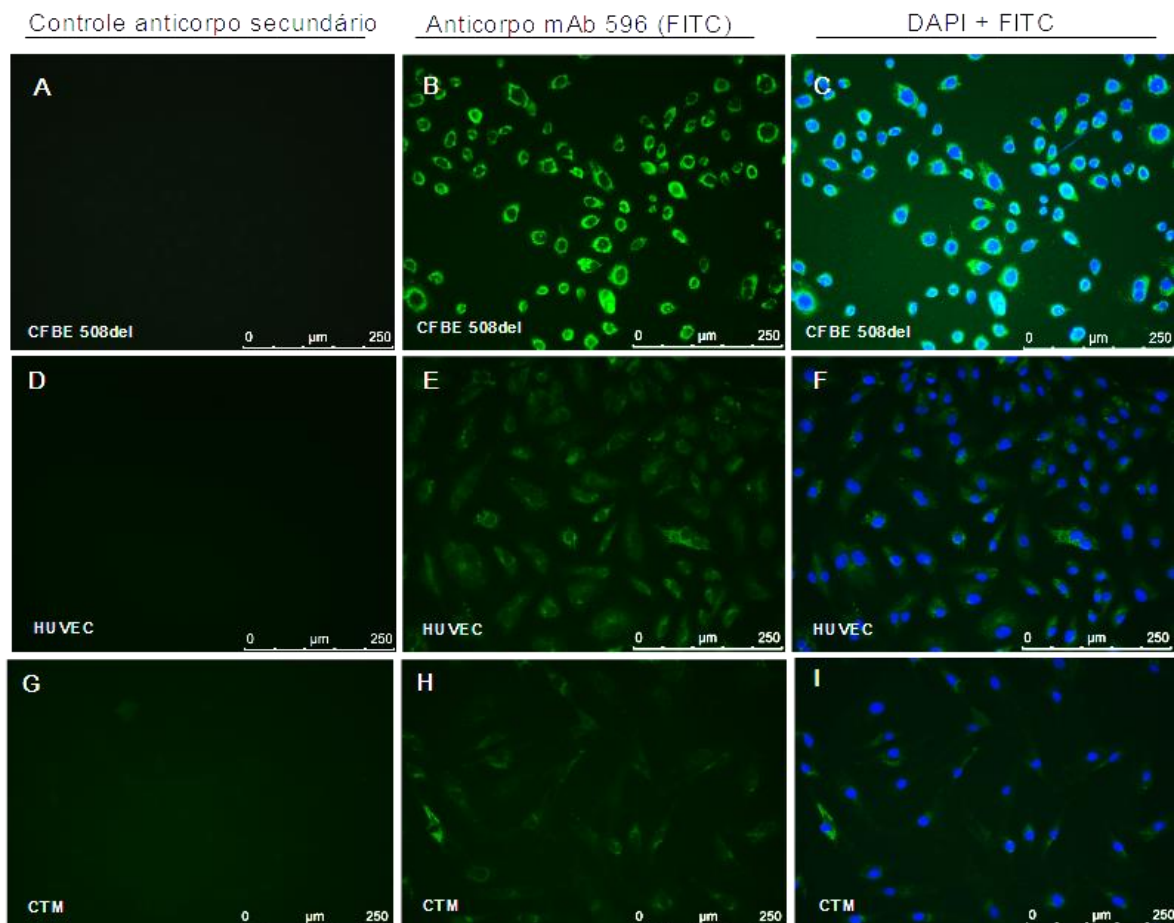


Figura 4.19– Imunofluorescência com anticorpo mAb 596 para marcação do CFTR em células CFBE 508del, HUVEC e célula-tronco mesenquimal (CTM). (A) controle do anticorpo secundário nas células CFBE 508del, (B) células CFBE 508del com canal CFTR marcado com anticorpo mAb 596 e anti-mouse conjugado com Alexa 488 em fitro FITC, (C) CFBE 508del com canal CFTR (FITC) e núcleos evidenciados com DAPI, (D) controle do anticorpo secundário nas células HUVEC, (E) células HUVEC com canal CFTR evidenciado por FITC, (F) HUVEC com canal CFTR (FITC) e núcleos evidenciados com DAPI, (G) controle do anticorpo secundário nas células tronco mesenquimais, (H) células tronco mesenquimais com canal CFTR evidenciado por FITC, (I) células tronco mesenquimais com canal CFTR (FITC) e núcleos evidenciados com DAPI.

Os resultados obtidos mostram a marcação citoplasmática do canal CFTR nas células HUVEC (Figura 4.19. D) utilizando o método de fixação com metanol e pós-fixação com paraformaldeído 4%, assim como nas células CFBE 508del pode-se observar a marcação do canal próxima ao núcleo (Figura 4.19



C), como descrito na literatura. Não há descrito na literatura a expressão do CFTR em células-tronco mesenquimais, porém foi observado uma marcação na região citoplasmática da célula, mas para confirmar se é possível estabelecer parâmetros para diferenciação, seria necessário uma célula-tronco mesenquimal isolada de um paciente homocigoto para F508del. Além disso, em nível de proteína, não é possível realizar uma comparação quantitativa entre duas linhagens celulares diferentes (CFBE e HUVEC), a fim de que esta abordagem foi descontinuada neste projeto.

#### **4.3.2 Detecção a nível de DNA por PCR convencional**

A mutação F508del é caracterizada pela deleção de três nucleotídeos (CTT) correspondente ao aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR. Por conseguinte, é possível identificar uma célula selvagem de uma célula mutante através da análise do DNA pela reação de polimerase em cadeia (PCR), com uso de *primers* específicos que anelam somente no DNA mutante ou selvagem (FIGUEREDO LAGO et al., 2017; PERONE et al., 2010). As sequências dos primers específicos foram obtidas da literatura de acordo com o trabalho de PERONE e colaboradores (2010) sendo estes sintetizados e purificados por PAGE para garantir integridade da sequência. O tamanho do fragmento obtido na amplificação foi de 246 pb e a temperatura ótima de anelamento foi de 58°C após padronização. Como controle do experimento foi utilizado o DNA de uma outra célula selvagem, no caso DNA de célula-tronco, visto que, foi verificado por sequenciamento pelo método de Sanger que o DNA da célula CFBE selvagem possui mutação na região 508del e a população célula CFBE mutante apresentou heterogeneidade em sua sequência, indicativo que na população não havia somente células F508del, conforme apresentado na Figura 4.20.

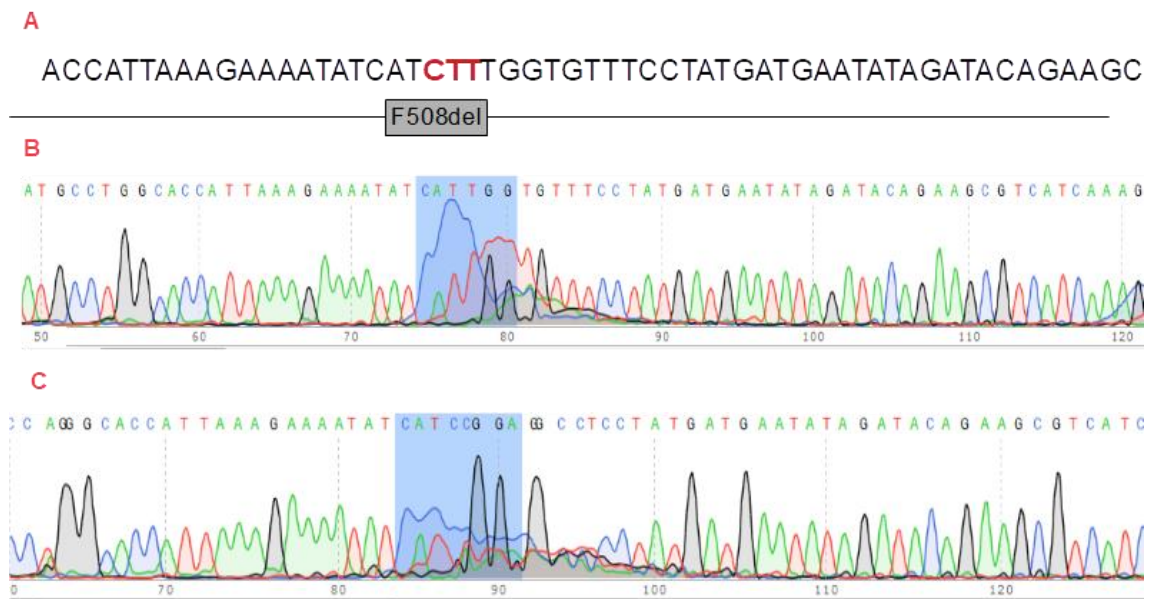


Figura 4.20 Sequenciamento de DNA pelo método de Sanger. Em (A) sequência do fragmento do gene CFTR obtida na base de dados NCBI com os três nucleotídeos (CTT) que são deletados na mutação F508del evidenciados em vermelho, (B) dado de sequenciamento do DNA da célula CFBE selvagem, na qual aparece a deleção dos três nucleotídeos e um ruído na região da mutação indicando que a célula não apresenta a sequência do CFTR selvagem (C) dado de sequenciamento da célula CFBE 508del que apresenta deleção dos três nucleotídeos na posição 508, além disso é observado um ruído na região, indicativo de heterogeneidade da população.

A Figura 4.21 apresenta o gel de agarose 2% com o produto da PCR utilizando *primers* específicos para a célula selvagem (célula-tronco mesenquimal isolada de tecido adiposo) e mutante (CFBE F508del). As setas vermelhas indicam o fragmento do tamanho esperado (246 pb) e a banda superior (em torno de 650 pb) representa outra amplificação, indicando que os *primers* reconhecem e amplificam outra região do genoma.

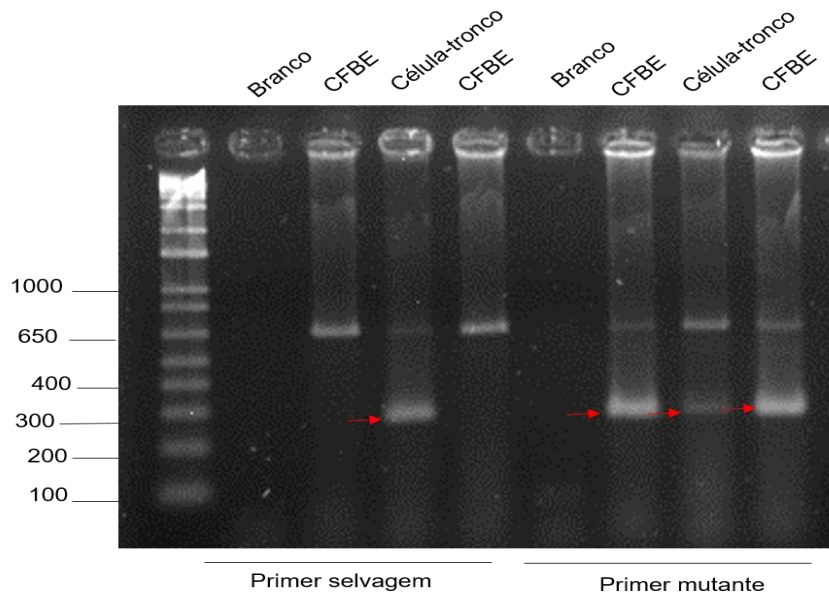


Figura 4.21– PCR em gel de agarose mostrando a detecção no DNA da ausência da mutação F508del com *primers* específicos. Gel de agarose 2% marcador de peso molecular de 1kb e o produto de PCR com os primers específicos para células selvagem (célula-tronco) e mutante (CFBE) corado por GelRed® Nucleic Acid Gel Stain e visualizado em fotodocumentador LPIX após exposição luz ultravioleta. O produto amplificado esperado de 246 pb, indicado pelas setas vermelhas.

Pode-se observar que a sequência do *primer* desenhado para célula mutante não é capaz de fazer a distinção entre células normais e mutantes nas condições testadas, pois o DNA da célula-tronco é amplificado mesmo aumentando a temperatura de anelamento (até 66°C). Foram testados DNA de outras duas células selvagens (linhagem de célula-tronco embrionária H1 e célula da linhagem HUVEC) e o resultado se manteve. O *primer* desenhado para a célula selvagem possibilitou a diferenciação do DNA de célula mutante (CFBE 508del) e selvagem, em 58°C, e por esta razão foi utilizado para confirmar a correção da mutação realizadas por CRISPR.

### 4.3.3 Quantificação das edições por PCR quantitativa (qPCR)

A técnica de qPCR é baseada na adição de um fluoróforo que emite fluorescência quando se intercala na dupla-fita do DNA. Desta maneira, é possível correlacionar o grau de fluorescência com a quantidade de DNA na amostra. Assim, a técnica pode ser utilizada para determinar a quantidade de

DNA selvagem após a aplicação do CRISPR nas células CFBE 508del evidenciando assim se houve correção da mutação.

Uma vez padronizada a reação de PCR convencional com o *primer* que reconhece o DNA selvagem (sem a mutação), iniciamos a padronização da técnica de qPCR que possibilita a quantificação do DNA selvagem presente na amostra através do ciclo de amplificação, inferindo assim, a edição. A Figura 4.22 apresenta uma curva contendo DNA selvagem e mutante em diferentes proporções de modo a correlacionar o ciclo de amplificação (Cq) com a porcentagem de DNA selvagem (ou corrigido) presente em uma amostra. A concentração de 240 ng de DNA equivale a 100% e as misturas de DNA selvagem e mutante seguem esta mesma proporção (porcentagem x concentração).

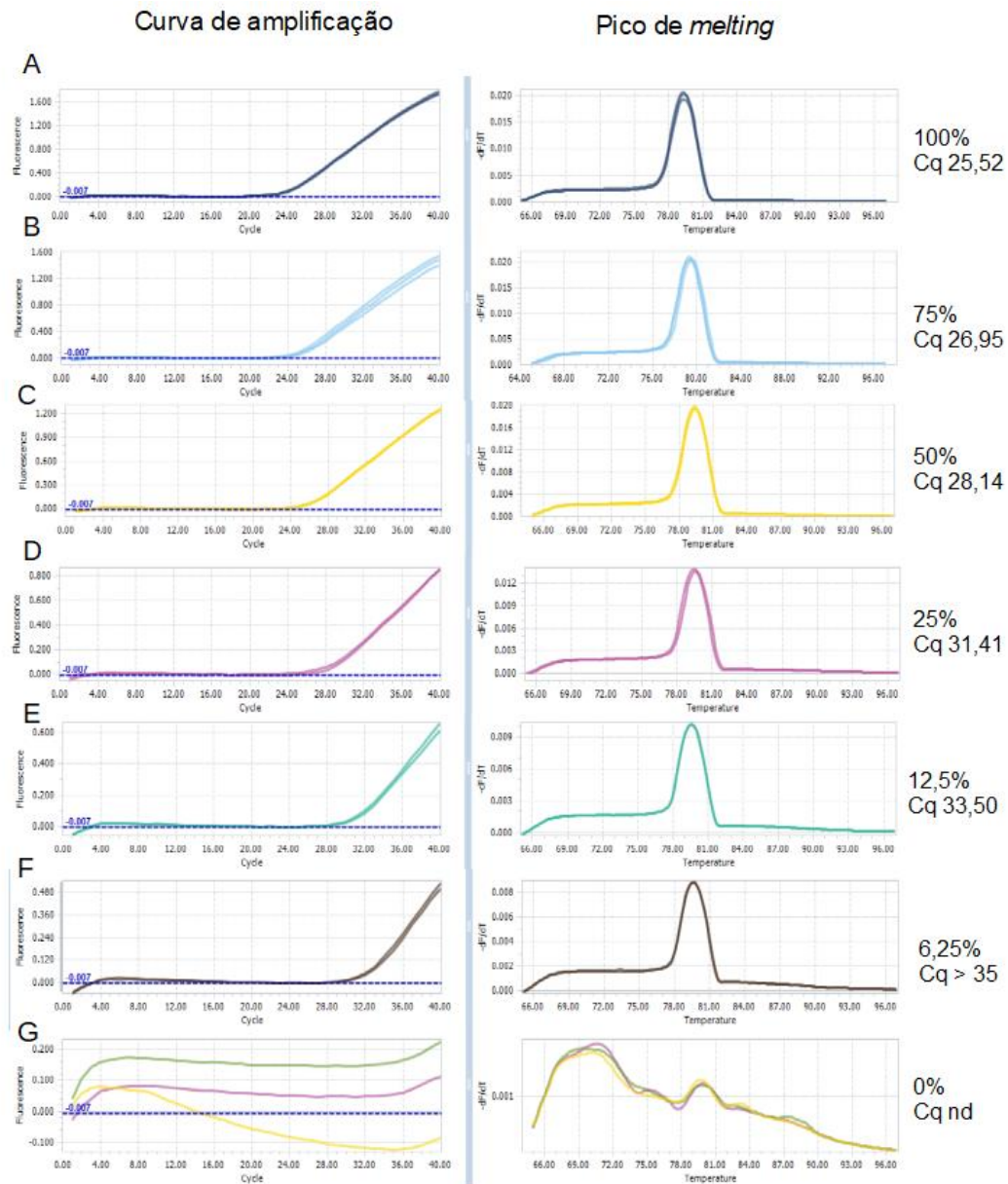


Figura 4.22 Detecção no DNA da ausência da mutação F508del por qPCR. Curvas de amplificação e melting obtidas pelo programa LightCycler 96 SW. (A) Curva de amplificação com 240 ng inicial de DNA genômico (100%) extraído de célula-tronco (selvagem). (B) Curva de amplificação com 180ng inicial de DNA genômico selvagem (75%) e 60 ng (25%) de DNA extraído da célula CFBE (F508del). (C) Curva de amplificação com 120 ng inicial de DNA genômico selvagem (50%) e 120 ng (50%) de DNA extraído da célula CFBE (F508del). (D) Curva de amplificação com 60 ng de DNA genômico selvagem (25%) e 180 ng (75%) de DNA extraído da célula CFBE (F508del). (E) Curva de amplificação com 30ng de DNA genômico selvagem (12,5%) e 210 ng (87,5%) de DNA extraído da célula CFBE (F508del). (F) Curva de amplificação com 15ng inicial de DNA genômico selvagem (6,25%) e 225 ng (93,75%) de DNA extraído da

célula CFBE (F508del). (G) Curva de amplificação com 240 ng de DNA extraído da célula CFBE (F508del).

A concentração de DNA na amostra deve estar relacionada com o ciclo de amplificação seguindo um perfil linear, após a aplicação do logaritmo no eixo x (concentração). A Figura 4.23 apresenta o gráfico obtido relacionando o ciclo de amplificação (Cq) com a concentração de DNA em escala logarítmica, o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,99 que estima a variação de cada ponto do gráfico a uma equação de primeiro grau ( $y= ax+b$ ). Os valores obtidos com a curva foram: slope -9,575, eficiência de 1,27 e erro de 0,37. Estes valores evidenciam que existe uma relação entre a concentração de DNA selvagem *versus* ciclo de amplificação diretamente proporcional. Além disso, essa curva possibilitou a determinação do limite de sensibilidade da técnica, sendo possível detectar o sinal da reação a partir de valores superiores a 12.5% de DNA selvagem ou corrigido.

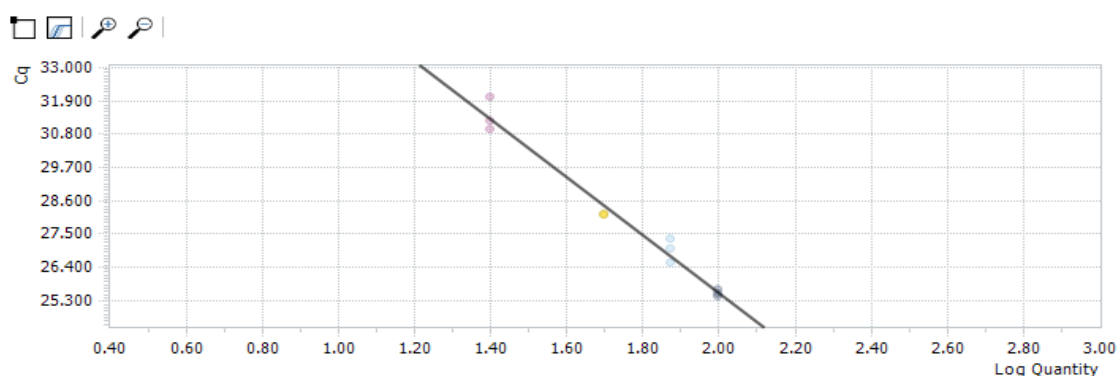


Figura 4.23 Curva de diluição de DNA de célula-tronco para correlacionar concentração de DNA com o ciclo de amplificação como forma de prever a eficiência dos *primers*.

#### 4.3.4 Transfecção do plasmídeo e avaliação da correção

Para avaliar se a ferramenta de edição construída, no modelo de plasmídeo, corrige a mutação F508del foi realizada a transfecção das células na presença e ausência da droga hidroxiureia para todos os sgRNAs. A Figura 4.24, representativa para um dos sgRNAs, mostra a eficiência de transfecção através da expressão do gene da proteína vermelha fluorescente. A separação destas células foi realizada pela técnica de *sorting*, possível apenas, para as condições não tratadas com hidroxiureia, por conta da quantidade inicial de células necessárias para o experimento.

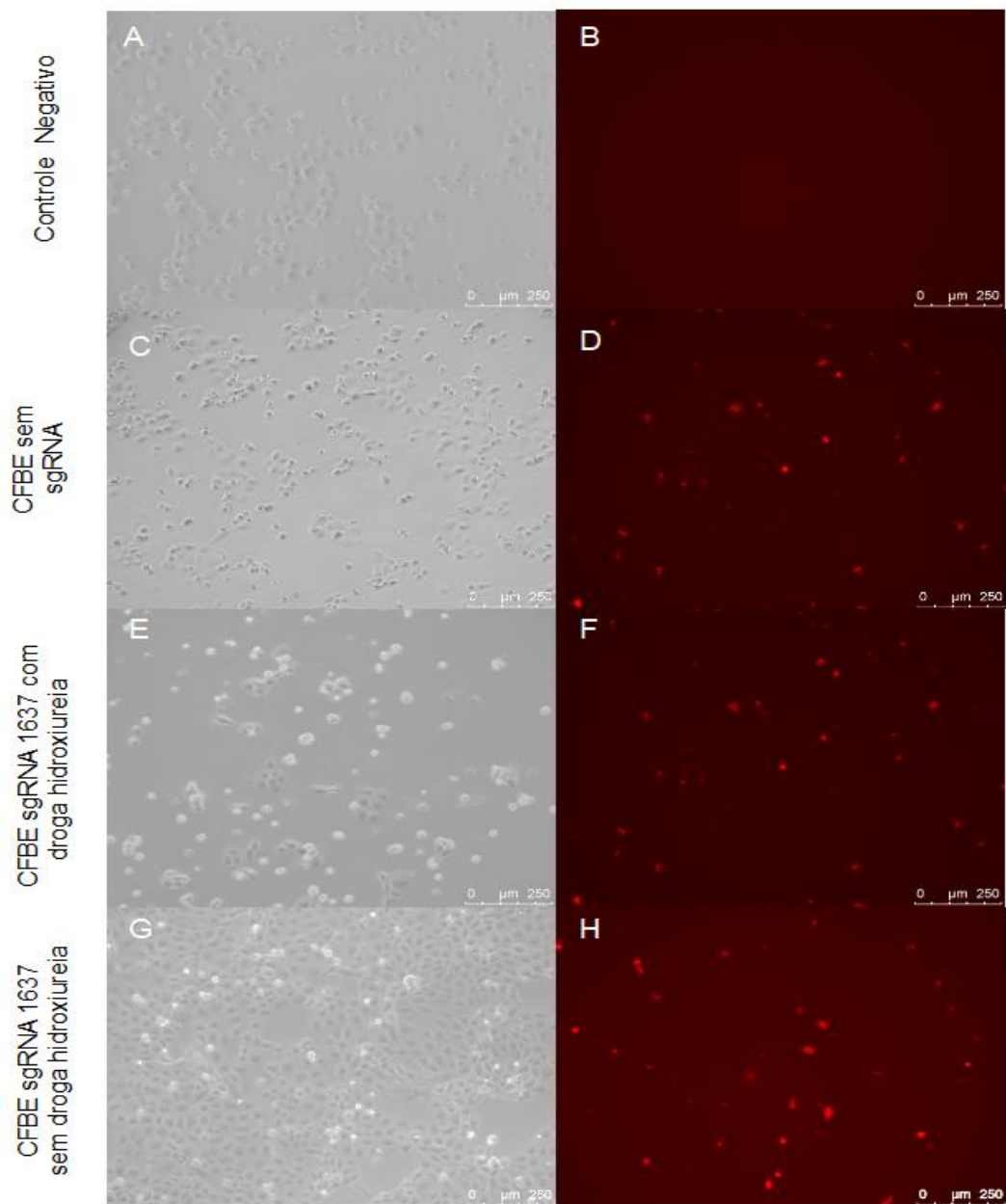


Figura 4.24 Transfecção das células CFBE (508del) com plasmídeo px458 contendo ou não a sequência dos sgRNAs usando Lipofectamina 3000. As fotos foram tiradas após 48 horas de transfecção em que podem ser observadas a morfologia em microscopia de contraste de fase e com o filtro TRITC para fluorescência em vermelho. Em (A) microscopia de contraste de fase e (B) filtro TRITC apresentam o controle negativo que não recebeu o plasmídeo. Em (C) microscopia de contraste de fase e (D) filtro TRITC utilizando 2µg de plasmídeo px458 sem a sequência do sgRNA e na ausência da droga hidroxiureia. Em (E) microscopia de contraste de fase e (F) filtro TRITC utilizando 2µg de plasmídeo px458 com a sequência 1637 de sgRNA e na

presença da droga hidroxiureia. Em (G) microscopia de contraste de fase e (H) filtro TRITC utilizando 2µg de plasmídeo px458 com a sequência 1637 de sgRNA sem droga hidroxiureia.

As células separadas foram expandidas em cultura e, após quantidade mínima de  $5 \times 10^5$  células, o DNA da população foi extraído. A avaliação da correção da mutação foi realizada pelas técnicas de PCR e qPCR, conforme apresentado na Figura 4.25 e 4.26, respectivamente. Como um controle interno, para verificar se há DNA nas amostras, foi utilizado o par de *primers* do experimento de clivagem *in vitro* para PCR convencional, pois estes amplificam a região de 906pb do gene CFTR. Para a qPCR foram utilizados os *primers* do experimento do sequenciamento que amplifica um fragmento de 260pb.

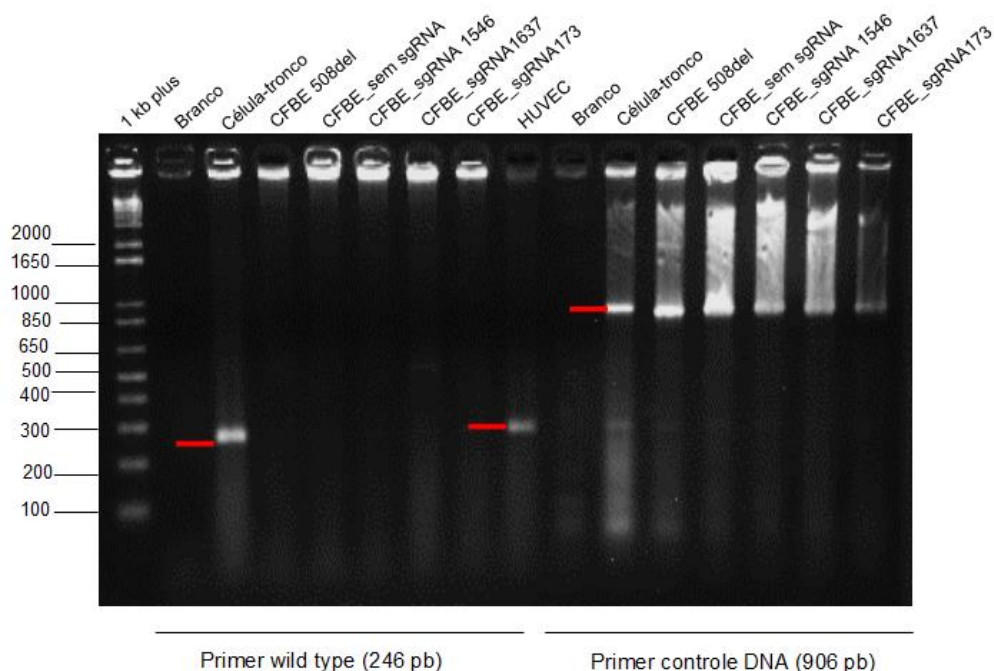


Figura 4.25 Verificação da correção da mutação por PCR em células que receberam o sistema CRISPR. Gel de agarose 2% com marcador de peso molecular 1kbplus, corado com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain e visualizado em fotodocumentador *LPIX* após exposição luz ultravioleta. A seta vermelha indica o tamanho dos fragmentos esperados. A amplificação ocorreu apenas no DNA das células usadas como controle. O DNA das células submetidas ao CRISPR e expandidas após a seleção por sorting não apresentam evidências de correção. Como controle da qualidade da extração de DNA e da PCR foi amplificado uma porção do gene CFTR (906pb) das amostras.

Pela técnica de PCR convencional, nas condições testadas, não foi possível verificar evidências da correção da mutação, como mostrado na Figura 4.25. Os dados mostram que apenas o DNA das células usadas como controle



(célula-tronco e da linhagem HUVEC) apresentaram amplificação e que há DNA em todas as amostras pois foram amplificadas com o primer controle (fragmento de 906pb). A técnica de qPCR, por apresentar maior sensibilidade que a PCR convencional, foi utilizada para verificar se existiu correção. Para este fim, foi utilizado a quantidade de 240ng de DNA de cada amostra e as curvas de amplificação e picos de *melting* são mostrados na Figura 4.26, como controle interno houve a amplificação de um fragmento de 260pb do gene CFTR, mostrando que há DNA na amostra (dados não mostrados). De acordo com a curva de diluição com DNA selvagem e com mutação (Figura 4.22), o limite de sensibilidade da técnica está em apresentar 12.5% de correção da mutação. Assim, podemos concluir que a correção é inferior a esse valor ou nula.

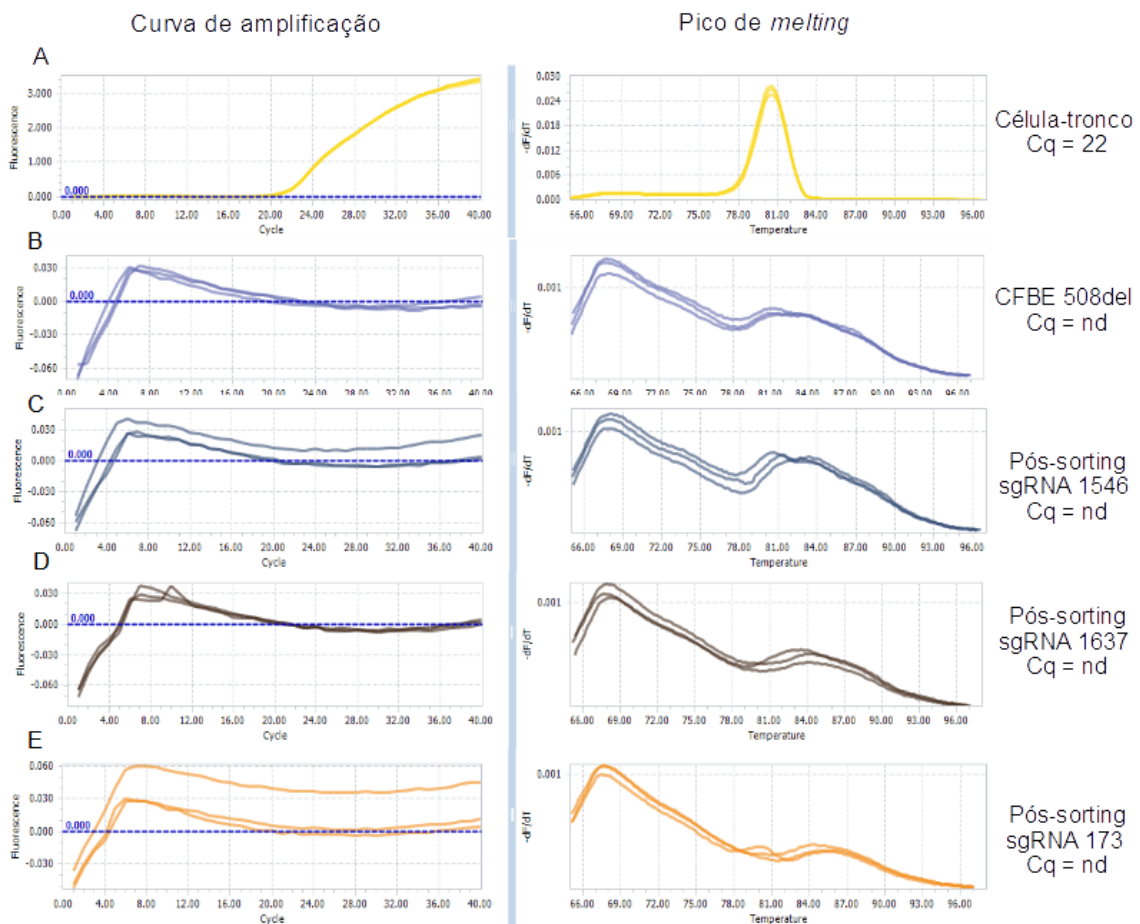


Figura 4.26 Detecção no DNA da correção da mutação F508del por qPCR. Curvas de amplificação e melting obtidas pelo programa LightCycler 96 SW usando 240 ng de DNA. (A) Controle positivo – DNA de célula-tronco. (B) Célula mutante (CFBE508del). (C) CFBE508del transfetada com sgRNA1546. (D) CFBE508del transfetada com sgRNA1637 (E) CFBE508del transfetada com sgRNA173.

Por fim, as amostras foram enviadas para sequenciamento pelo método de Sanger a fim de verificar se há alteração na sequência de nucleotídeos no

fragmento do gene. A Figura 4.27 apresenta os cromatogramas obtidos no sequenciamento para cada uma das amostras que receberam os sgRNAs (1546,1637 e 173). A seta azul indica o local da deleção dos 3 nucleotídeos (CTT), conforme os dados obtidos, pode-se observar um ruído no local da deleção da célula CFBE 508del e além disso, não há evidências de que pelo menos parte da população foi corrigida, conforme mostrado pelo alinhamento das sequências com o software Clustal (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), apresentado na Figura 4.28.

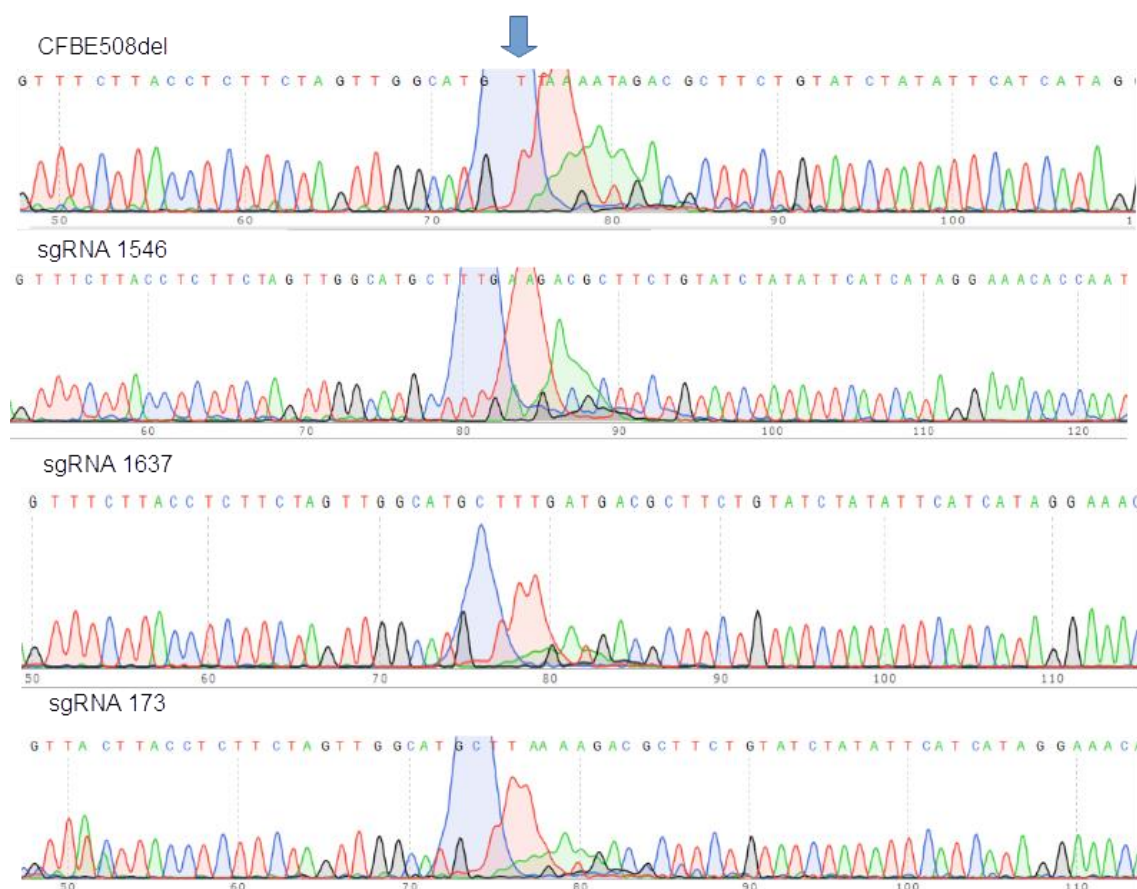


Figura 4.27 Cromatograma obtido após sequenciamento pelo método de Sanger das amostras submetidas ao CRISPR. CFBE508del apresenta a célula sem receber o plasmídeo com a sequência dos sgRNAs. E as respectivas amostras submetidas ao CRISPR, após o sorting, com

os sgRNA1546, sgRNA1637 e sgRNA173. A seta azul indica o local da mutação F508del em que os três nucleotídeos CTT estão ausentes.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

173rF      ----AAAAGCAAGTGGAGATTTTCATTCTGTTCTCAGTTTTTCCTGGATTATGCCTGGCACC      56
1637F      AATAGCCCCAGATGGAAGATTTTCATTCTGTTCTCAGTTTTTCCTGGATTATGCCTGGCACC      60
1546F      GGTTAGCCACGGTGGAGGATTTTCATTCTGTTCTCAGTTTTTCCTGGATTATGCCTGGCACC      60
C508delF   --GTTAGCCAAGTGGAGATTTTCATTCTGTTCTCAGTTTTTCCTGGATTATGCCTGGCACC      58
           * *****

173rF      ATTAAGAAAATATCATTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCATCAA      116
1637F      ATTAAGAAAATATCATTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCATCAA      120
1546F      ATTAAGAAAATATCATTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCATCAA      120
C508delF   ATTAAGAAAATATCATTGGAGTTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCATCAA      118
           *****

173rF      GCATGCCAACTAGAAGAGGTAAGAAACTATGGAAGAACTTTTGATTATGCATATGAACC      176
1637F      GCATGCCAACTAGAAGAGGTAAGAAACTATGTGAAACTTTTTGATTATGCATATGAACC      180
1546F      GCATGCCAACTAGAAGAGGTAAGAAACTATGTGAAACTTTTTGATTATGCATATGAACC      180
C508delF   GCATGCCAACTAGAAGAGGTAAGAAACTATGTGAAACTTTTTGATTATGCATATGAACC      178
           ***** ** *

173rF      CTTCACTACCCAAATTATATATTTGGCTCCATATTCATCGGTAAAA      225
1637F      CTTCACTACCCAAATTATATATTTGGCTCCATATTCATCGGTAAAA      229
1546F      CTTCACTACCCAAATTATATATTTGGCTCCATATTCATCGGTAAAA      229
C508delF   CTTCACTACCCAAATTATATATTTGGCTCCATATTCATCGGTAAAA      227
           *****

```

Figura 4.28- Alinhamento das seqüências das células CFBE508del sem receber o sgRNA e com as seqüências dos sgRNAs 173, 1637 e 1546 obtidas pelo software Clustal (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Os resultados obtidos evidenciam que não há inserção dos três nucleotídeos indicativos da correção da mutação F508del. Contudo, os dados de alinhamento mostram que ocorreram alguns eventos de inserção, deleção ou mudança de base nas seqüências que receberam a seqüência do sgRNA. A quantificação desses eventos de inserção e deleção foi realizada com o software TIDE (<http://shinyapps.datacurators.nl/tide/>) proposto no trabalho de Brinkman e colaboradores (2014). O gráfico apresentado pelo software mostra a porcentagem de eventos de inserção e deleção quando comparado ao cromatograma da seqüência controle (CFBE F508del), na Figura 4.29 está representado o resultado para o sgRNA 173 gerado por esse software.

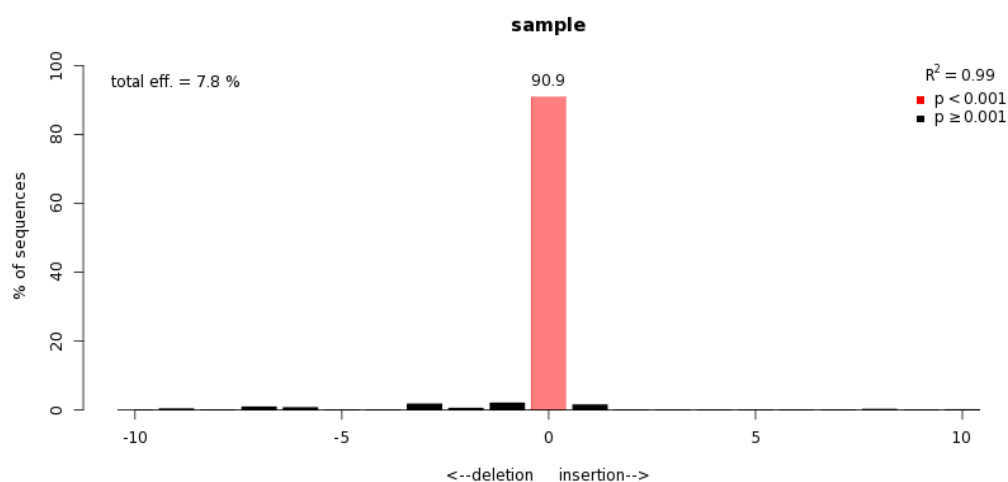


Figura 4.29- Gráfico obtido pelo software TIDE (<http://shinyapps.datacurators.nl/tide/>) para o DNA extraído das células transfectadas com o sgRNA 173 e selecionadas por *sorting*. O gráfico mostra a porcentagem de eventos de inserção e deleção comparados a sequência controle (CFBE508del).

A Tabela 4.6 apresenta a porcentagem de *indels* para os outros sgRNAs quando as sequências foram comparadas com o controle sem sgRNA.

sgRNA	% <i>indels</i>
1546	0,1%
1637	3,3%
173	7,8%

Tabela 4.6- Porcentagem de *indels* gerados por cada sgRNA calculados no software TIDE com base no cromatograma de cada sgRNA comparado com o controle CFBE508del.

Os dados evidenciam uma baixa produção de *indels* para todas as sequências dos sgRNAs, inseridas no modelo de plasmídeo. Como as células foram submetidas a técnica de *sorting*, que permite a separação das células que receberam o plasmídeo que contém os elementos necessários para edição pela ferramenta, era esperado algum nível de correção ou então uma porcentagem maior de *indels* nas regiões próximas da região de clivagem pela proteína SpCas9. Apesar da baixa porcentagem de *indels* o resultado corrobora os dados obtidos no trabalho de Smirnikhina e colaboradores (2020) que mostraram a porcentagem de *indels* variando entre 1,25% a 2,54% na célula de linhagem de epitélio traqueal de fibrose cística (CFTE29o-) dependendo da sequência de sgRNA utilizada. Além disso, para estes tipos celulares a frequência de *indels* observada não excede valores entre 8% e 14% (SMIRNIKHINA et al., 2020).

### 4.3.5 Transfecção da Ribonucleoproteína

Para avaliar a ferramenta de edição construída, no modelo de ribonucleoproteína que reconhece e cliva o DNA *in vitro*, corrigiu a mutação F508del foi realizada a transfecção das células na presença e ausência da droga hidroxureia para todos os sgRNAs. Após 48 horas da transfecção o DNA total da população foi extraído, pelo método do tampão alcalino e a correção avaliada por PCR convencional conforme apresentada na Figura 4.30 e as amostras tratadas com hidroxureia foram avaliadas também por qPCR conforme apresentado na Figura 4.31. De maneira semelhante, pelas técnicas testadas não foi possível obter evidências da correção molecular utilizando o complexo ribonucleoproteico mesmo na presença de hidroxureia.

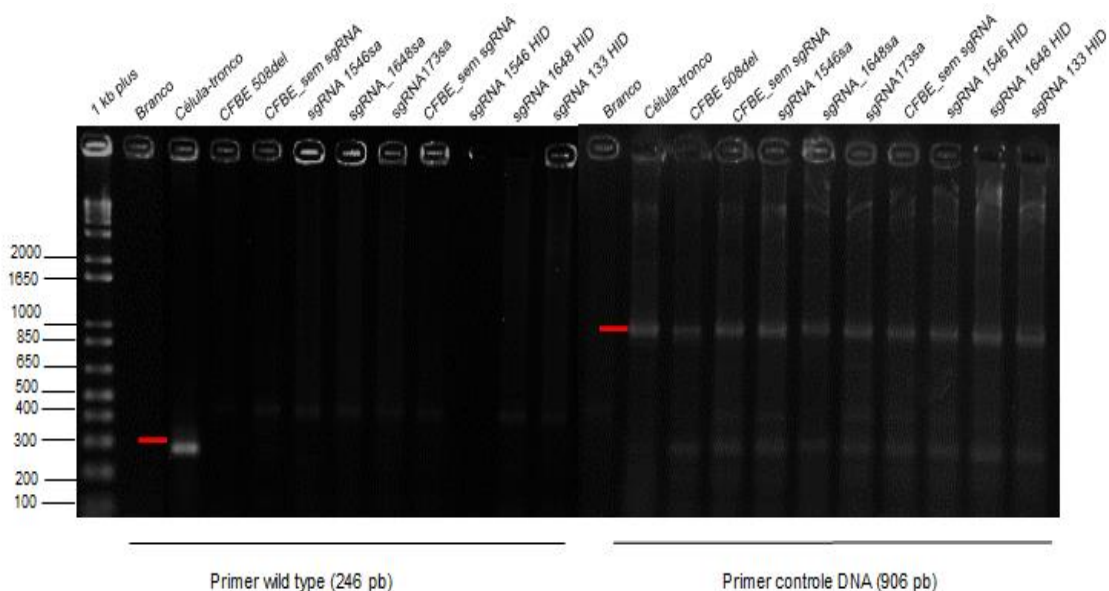


Figura 4.30 Gel de agarose 2% com marcador de peso molecular 1kbplus, corado com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain e visualizado em fotodocumentador *LPIX* após exposição luz ultravioleta. A seta vermelha indica o tamanho dos fragmentos esperados. Experimento realizado para verificação da correção da mutação por PCR em células que receberam o sistema CRISPR no complexo ribonucleoproteico. A amplificação ocorreu apenas no DNA das células usadas como controle. O DNA das células submetidas ao CRISPR não apresentou evidências de correção. Como controle da qualidade da extração de DNA e da PCR foi amplificado uma porção do gene CFTR (906pb) das amostras. HID = hidroxureia

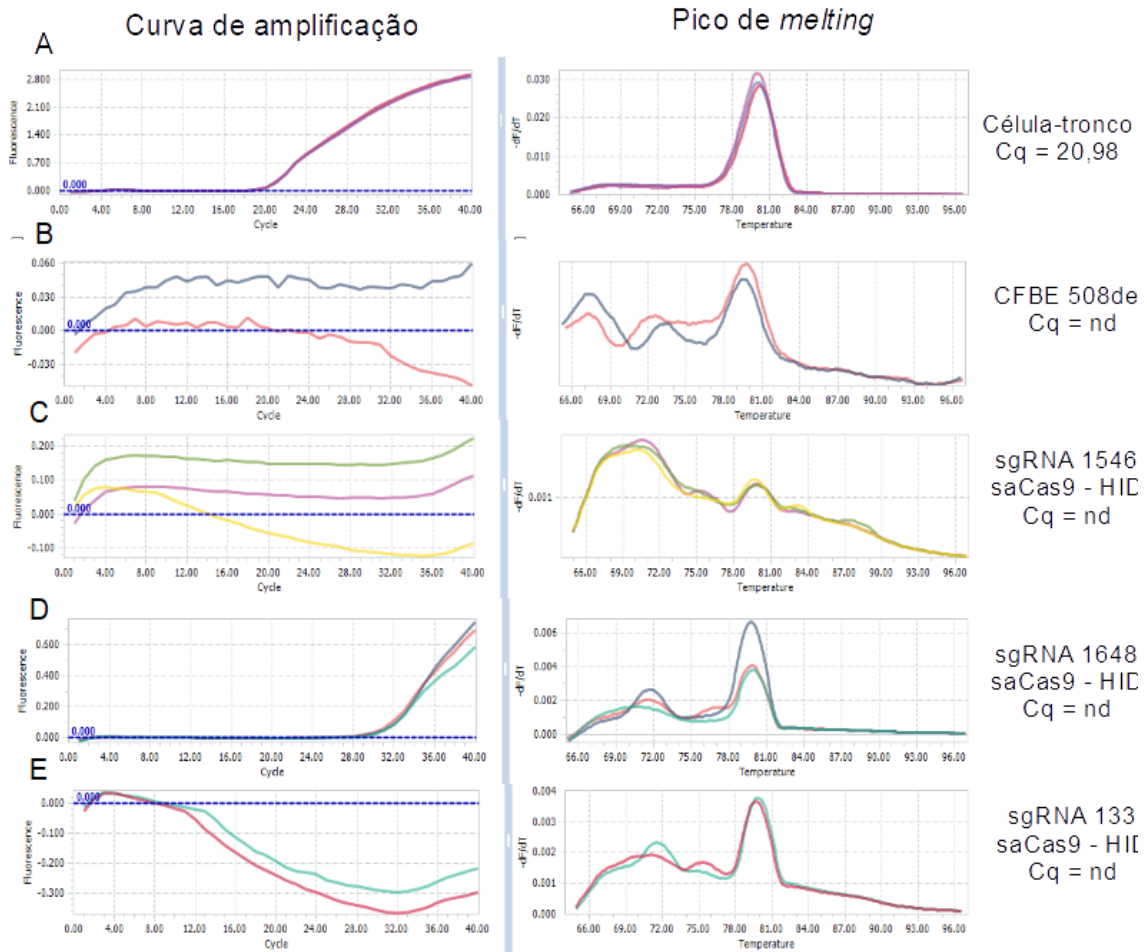


Figura 4.31 -. Curvas de amplificação e melting obtidas pelo programa LightCycler 96 SW usando 240 ng de DNA. (A) Controle positivo – DNA de célula-tronco. (B) Controle negativo - célula mutante (CFBE 508del). (C) CFBE508del transfetada com sgRNA1546 (D) CFBE508del transfetada com sgRNA1648 (E) CFBE508del transfetada com sgRNA133. HID = hidroxureia

Os resultados apresentados evidenciam que não foi possível corrigir e/ou detectar a correção com as ferramentas e técnicas utilizadas. As células que receberam o sgRNA 1648, na presença de hidroxureia via complexo ribonucleoproteico, apresentaram um sinal de amplificação, porém não foi detectado pelo equipamento não gerando um valor de Cq, mas que observando o gráfico pode ter ficado em torno de 33. O resultado obtido pode indicar correção usando esta sequência de sgRNA, mas são necessários mais experimentos para confirmação deste resultado. Na literatura, o complexo ribonucleoproteico é descrito por apresentar maior eficiência na edição por CRISPR o que confirma uso desta abordagem como promissora.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Construção de Ferramentas

A aplicação do sistema CRISPR para edição genética envolve a construção de ferramentas moleculares e a verificação se estas são efetivas para o propósito. No que diz respeito ao plasmídeo px458, a sequência de cada sgRNA foi confirmada por PCR, digestão enzimática e sequenciamento, indicando que a ferramenta pode ser utilizada na edição. Outra etapa consistiu na padronização do método de transfecção, de forma a mensurar quantas células receberam o plasmídeo, para avaliar a eficiência da estratégia empregada. Os melhores resultados foram obtidos usando o reagente lipídico Lipofectamina 3000 com eficiência de cerca de 9%, de maneira a comparar os métodos de transfecção e relacionar com os resultados obtidos, alguns trabalhos merecem ser mencionados.

Em 2010, Maurisse e colaboradores relataram os resultados de transfecção em células epiteliais de traqueia humana (HTE) comparando a eficiência da transfecção com Lipofectamina 2000 com 14%, enquanto por eletroporação a eficiência foi de 45%, indicando que o método de eletroporação foi mais efetivo (MAURISSE et al., 2010). Liang e colaboradores (2015) testaram a entrega do plasmídeo contendo a proteína Cas9 em 11 linhagens celulares e a Lipofectamina 3000 foi a mais eficiente, embora os resultados obtidos variassem de acordo com a linhagem celular. Foi obtido cerca de 49% de eficiência para célula HEK293, 15% para A549 células derivadas de carcinoma do epitélio pulmonar e 0% em células Jukart (linfócitos T) e células-tronco embrionárias (LIANG et al., 2015a). Por eletroporação os autores conseguiram resultados de transfecção para todas as células testadas ainda que com baixa eficiência para células-tronco embrionárias (8%). Na literatura é relatado que a entrada do DNA nas células usando lipídios catiônicos é fortemente dependente da massa de DNA transfectado visto que a formação de lipossomos é dependente do número de cargas negativas na molécula de DNA. Por outro lado, na eletroporação a entrada é principalmente correlacionada com a proporção molar de DNA transfectadas. Esta é uma distinção importante ao se comparar vetores de diferentes comprimentos e na comparação de diferentes métodos de transfecção (HORNSTEIN et al., 2016).

Lesueur e colaboradores (2016) relataram que a eficiência da transfecção por eletroporação diminuiu drasticamente com o aumento do tamanho do plasmídeo, tanto utilizando a mesma proporção em massa quanto em molaridade. Os autores compararam a eficiência da transfecção e sobrevivência celular, em células-tronco mesenquimais. Com o mesmo protocolo otimizado para a transfecção, quando utilizado um plasmídeo de 3,5kb a sobrevivência celular se mostrava em torno de 70% com eficiência de 80% na transfecção – medida através da expressão do gene repórter GFP. Entretanto, utilizando um plasmídeo maior (pCAGMKOSiE de 11,4 kbp), os autores descreveram reduções drásticas na sobrevivência celular, que se mostrou em torno de 30%, e a porcentagem de células que estavam expressando GFP era menor que 10% (LESUEUR; MIR; ANDRÉ, 2016).

No trabalho de Hornstein e colaboradores (2016) foi comparado a transfecção por eletroporação de vetores de DNA, para realizar o nocaute do gene GFP em células da linhagem HeLa. As células da linhagem já possuíam o gene GFP integrado ao genoma. O tamanho dos vetores variou de 383 a 4.548 pb e foi avaliado o nocaute do gene GFP comparando diferentes concentrações molares. Os autores descreveram que a entrada do vetor na célula não pareceu ser afetada pelo comprimento do vetor, contudo a eficiência do nocaute do gene GFP diminuiu com o aumento do tamanho do vetor (HORNSTEIN et al., 2016).

Em relação a ferramenta do complexo ribonucleoproteico, o sgRNA foi obtido por transcrição *in vitro* e o tamanho esperado visualizado em gel de agarose e pelo equipamento Bioanalyzer Agilent. No que diz respeito a funcionalidade da ferramenta, o complexo foi capaz de reconhecer e clivar o DNA alvo conforme mostrado no experimento de clivagem *in vitro* indicando que a ferramenta pode ser usada na cultura de células. As proporções testadas foram baseadas na literatura, no trabalho de Wang e colaboradores (2019) os autores testaram diferentes proporções do complexo do sgRNA e proteína em relação a quantidade de DNA usado como substrato, para este fim foi utilizado um fragmento de 810 pb do gene GFP e a clivagem resultando em um fragmento de 460 pb e 350 pb e utilizou a proporção de 20:20:1 para clivagem completa do



substrato em 2 horas de reação, quando a proporção molar era de 4:4:1 a eficiência na clivagem foi de 27% (WANG et al., 2019).

## 5.2 Sincronização do Ciclo Celular

A etapa de melhora do reparo dirigido por homologia (HDR) utilizou drogas do ciclo celular descritas na literatura que sincronizam o ciclo celular. O principal desafio na aplicação de drogas que atuam no ciclo celular é a toxicidade (YIANGOU et al., 2019). Logo, a primeira etapa foi a determinação da concentração de cada droga a ser utilizada para a finalidade desejada: De maneira geral, as concentrações obtidas no presente trabalho - 21,78 ng/mL de nocodazol e 46,80µg/mL de hidroxureia - são bem menores que as descritas na literatura: Tran e colaboradores (2019) utilizaram 200ng/mL de nocodazol em células de linhagem HEK293 por um período de 17 horas e obteve 72% de células na fase G2 logo após a remoção da droga (TRAN et al., 2019). Em outro trabalho, Yang e colaboradores (2014) testaram 1µg/mL de nocodazol durante 16 horas com 1 hora de recuperação em células-tronco embrionárias da linhagem H1. Os dados foram obtidos por citometria de fluxo, através da marcação do conteúdo de DNA com iodeto de propídeo, mostraram a sincronização de 79% das células (aumento de cerca de 2,5 vezes em relação as células não tratadas. Além disso, os autores relatam o aumento da taxa de reparo dirigido por homologia em linhagens de células humanas (YANG et al., 2014).

Para células-tronco embrionárias Yiangou e colaboradores (2019) testaram diferentes drogas e diferentes tempos de recuperação na avaliação do ciclo celular. A droga mimosina sincronizou mais de 70% das células na fase G1, porém após 16 horas todas as células morreram. Enquanto, a droga hidroxureia (2mM) enriqueceu cerca de 59% população de células-tronco embrionárias na fase S do ciclo celular e após 12 e 24 horas da retirada da droga 43% permanecia na fase S e 22% na fase G2/M, indicando uma progressão no ciclo celular após a retirada da droga. Para o nocodazol (200ng/mL), cerca de 80% das células foram sincronizadas na fase G2/M, e após a retirada da droga, as células progrediram no ciclo celular, mas após a remoção da droga 69% das células permaneceram na fase S em até 12 horas (YIANGOU et al., 2019).

### 5.3 Abordagens de Detecção

A detecção da edição genética utilizando CRISPR pode ser realizada por diferentes metodologias conforme a literatura da área. De maneira geral, para seleção das células que receberam as ferramentas de edição, alguns trabalhos publicados utilizam abordagens como: (1) uso de genes repórter para seleção das células (CHU et al., 2015; FIRTH et al., 2015; YANG et al., 2016; ZHANG et al., 2017a), (2) seleção de células que receberam o complexo seguido do isolamento em clones (*single cells*) (LIANG et al., 2015b; RAMLEE et al., 2015), (3) sequenciamento por Sanger após amplificação por PCR e clonagem em plasmídeo (PARK et al., 2020), (4) sequenciamento em larga escala (JO et al., 2019; RUAN et al., 2019; SMIRNIKHINA et al., 2020), (5) endonuclease T7 que cliva especificamente produtos de PCR em heteroduplex derivados de mutações heterozigóticas recém-geradas (HU et al., 2018; RAMLEE et al., 2015; RUAN et al., 2019; YANOVSKY-DAGAN et al., 2015), (6) análise de curva de fusão de alta resolução (HRM) que mede a quantidade de DNA de fita dupla em diferentes temperaturas, revelando assim a  $T_m$  de um produto de PCR específico (THOMAS et al., 2014) e (7) reação em cadeia da polimerase (PCR) e ensaio com enzimas de restrição (KIM et al., 2014). No entanto, alguns ensaios têm desvantagens por exigirem muito tempo e trabalho, com a separação de clones ou também se limitarem a sequências de nucleotídeos pré-determinadas. Outros, como o sequenciamento em larga escala ou separação das células, exigem equipamentos específicos e são de alto custo. Além disso, os eventos *indels* causados pela edição de CRISPR/Cas9 são frequentemente pequenos, portanto, a PCR padrão com DNA genômico não é útil para detectar os mutantes, uma vez que os tamanhos do amplicon não são diferentes o suficiente (UMKEHRER et al., 2020).

No presente trabalho, a identificação da correção foi realizada pela técnica de PCR convencional e qPCR, com um *primer* específico para a célula selvagem, seguido de sequenciamento pelo método de Sanger, porém essa abordagem não se apresentou muito efetiva. Haja vista, a baixa eficiência de correção, pela técnica de CRISPR/Cas9 no modelo utilizado, não permitiu mensurar a eficiência das ferramentas construídas com o uso da técnica de qPCR. Na literatura, há dois artigos que utilizam essa metodologia para a diferenciação (FIGUEREDO LAGO et al., 2017; PERONE et al., 2010), mas o

propósito de ambos é o diagnóstico da doença e mapeamento das mutações mais comuns da fibrose cística em amostras de pacientes. Dessa forma, o presente trabalho mostrou que apenas o primer que reconhece a sequência da célula selvagem estava específico. Alguns fatores como o ruído detectado por sequenciamento na célula mutante, indicativo de uma população mista, pode ter influenciado na especificidade e no potencial de detecção da técnica, explicando o porquê da dificuldade em padronização dessa técnica. Os dados também mostraram que o *primer* que reconhece apenas células mutantes, mesmo quando há aumento da temperatura de anelamento, não se mostrou específico também explicado pela presença do ruído na região final do anelamento do *primer* no DNA alvo. Portanto, para realizar a detecção das células corrigidas, outras estratégias precisam ser utilizadas de forma a refinar o método antes do envio das amostras para o sequenciamento.

Existem algumas estratégias para detectar pequenas quantidades de DNA em uma amostra que poderiam ser aplicadas na detecção. Pela técnica de PCR em tempo real, a quantidade de DNA alvo presente na amostra é proporcional ao ciclo de amplificação o que faz com que a sensibilidade para detectar alelos raros seja normalmente entre 1 e 10% (LONG; BERKEMEIER, 2020). Pela técnica de ddPCR é possível fracionar uma amostra em múltiplas partes de forma a conter o menor número de moléculas molde possível, para realizar a quantificação é usada a distribuição estatística de Poisson com base na medida da fluorescência do ponto final de um grande número de gotas da mesma amostra contando o número total de gotículas e positivas para fluorescência (LONG; BERKEMEIER, 2020). O trabalho de Miyaoka e colaboradores (2014) utilizou a tecnologia da TaqMan PCR com a PCR digital (ddPCR) para detectar o DNA de populações raras. Para rastrear os eventos de mutação, os autores desenharam par de primers e sondas TaqMan específicas conjugadas com diferentes fluoróforos que distinguem entre as sequências de DNA do tipo selvagem e mutantes. Aplicando a metodologia, foi possível detectar uma frequência alélica mutante média de 0,023% (MIYAOKA et al., 2014). Com essas diluições é possível encontrar DNA da população rara em meio a população total, o que melhora a sensibilidade da técnica.

Logo, os resultados obtidos pela técnica de ddPCR possibilitariam a detecção de baixas frequências alélicas presentes na amostra corrigida, visto que a eficiência da tecnologia de CRISPR em corrigir a mutação F508del varia de 0,2% até 41% conforme os trabalhos da área. Dessa forma, para que seja realizada a avaliação da correção é necessário estabelecer uma técnica que seja sensível e específica como a ddPCR ou sequenciamento em larga escala. A aplicação da técnica de qPCR é promissora desde que aplicada em conjunto com a seleção clonal e que sejam estabelecidos todos os parâmetros da reação. A sequência do par de *primers* construídos determinará a especificidade fazendo com que apenas a sequência corrigida seja amplificada, porém a presença de *indels* não será quantificada, sendo necessário a confirmação pela técnica de sequenciamento. A técnica de qPCR, realizada nas condições mencionadas, apresentou uma sensibilidade de detectar, aproximadamente, 12,5% de correção. Portanto, para aplicação desta metodologia, a eficiência na correção deve ser maior que o limite de detecção da técnica. Conforme os dados apresentados no presente trabalho, a linhagem celular CFBE 508del não apresentava uma população homogênea além de apresentar alterações no cariótipo, com mais cromossomos que uma célula humana normal (Anexo B). Estes fatores podem ter influenciado nos resultados obtidos.

#### **5.4 Comparação de técnicas e resultados**

Ao se falar sobre edição do gene CFTR, existem trabalhos publicados que envolvem o uso de três ferramentas de edição: nucleases dedo de zinco (ZFN), TALEN e CRISPR/Cas9. Embora os mecanismos moleculares das ferramentas e resultados obtidos sejam semelhantes, o uso da tecnologia CRISPR e as eficiências de correção mediadas por HDR merecem um destaque. De maneira geral, a eficiência em corrigir a mutação F508del varia de 0,2% (SCHWANK et al., 2013) a 41% (VAIDYANATHAN et al., 2020) e fatores como método de transfecção, tipo celular, desenho de sgRNA e estratégia de seleção variam muito entre os trabalhos publicados. Portanto, os trabalhos presentes na literatura acerca desta temática serão apresentados para entender os diferentes aspectos que podem influenciar na eficiência de edição. Assim é possível comparar as estratégias de transfecção e metodologias para detectar a correção por HDR nos trabalhos publicados com o presente trabalho desenvolvido.

Primeiramente, os trabalhos publicados envolvendo aplicação da tecnologia CRISPR/Cas9 para corrigir a mutação F508del *in vitro* iniciam em 2013 com o trabalho de Schwank e colaboradores. Os autores usaram como modelo células de organoides intestinais que receberam o sistema CRISPR em plasmídeo usando como método de transfecção o agente lipídico Lipofectamina. Para verificar a ocorrência do mecanismo de reparo dirigido por homologia (HDR) foram adicionadas duas mutações silenciosas na sequência do braço de homologia e após seleção clonal, a correção foi avaliada por sequenciamento por Sanger. Além disso, a análise dos *off-targets* preditos *in silico* foi realizada por sequenciamento dos clones individuais, sendo detectado apenas 1 *off-target* localizado em um íntron. Também foi realizado um ensaio funcional com o indutor forskolina e inibidores do CFTR evidenciando que os clones corrigidos apresentam funcionalidade do canal semelhante à célula selvagem, nas condições do ensaio. Portanto, o trabalho mostrou que é possível corrigir a mutação F508del no modelo, mas a eficiência obtida na edição gênica foi muito baixa, uma vez que sem realizar seleção clonal os autores obtiveram 0,2% de eficiência de correção.

Apesar de não utilizar as ferramentas do CRISPR, o trabalho de Lee e colaboradores (2012) apresenta resultados interessantes uma vez que utiliza a técnica de PCR para mensurar a taxa que ocorre cada tipo de mecanismo de reparo – junção das extremidades não homólogas (NHEJ) ou reparo dirigido por homologia (HDR). No trabalho, os autores utilizaram as nucleases dedo de zinco para excisar um fragmento do gene CFTR em um modelo de células de epitélio traqueal de fibrose cística (CFTE). Com o objetivo de inserir a sequência correta e pelo mecanismo de reparo por HDR corrigir a mutação F508del, os componentes da edição foram entregues para a célula usando o reagente lipídico Lipofectamina 2000. A verificação da correção foi realizada pela técnica de PCR em dois passos, e porcentagem de cada evento foi calculada através do tamanho do fragmento amplificado, bem como, a presença de sítios de enzimas de restrição. Ao utilizar esta metodologia, os autores encontraram uma eficiência de NHEJ de 7,8% enquanto não houve evidências do mecanismo de HDR, inferindo que a eficiência foi menor que 1% devido ao limite de detecção da técnica.

Em outro trabalho, Firth et al., (2015) reprogramou fibroblastos isolados de pacientes com fibrose cística para células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC). Os componentes do CRISPR foram colocados em plasmídeo e o DNA doador (template) foi construindo de modo a conter o gene de resistência a puromicina para seleção. Após 48 horas, as células foram tratadas com o antibiótico e os clones sobreviventes selecionados, de um total de 36 clones analisados por PCR 16,7% apresentavam inserção do *template* e a correção da mutação realizada. Após a edição, as células mantiveram o potencial de diferenciação e a proteína CFTR glicosilada, característica do canal CFTR selvagem, foi visualizada pela técnica de western blot.

O trabalho publicado por Smirnikhina e colaboradores (2020) realizou a edição da mutação F508del em células epiteliais de traqueia (CFTE29o-) e em células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC). No modelo experimental, foram testadas três variações de sgRNA e 2 variações da proteína Cas9, sendo as ferramentas entregues por meio de plasmídeo usando reagente lipídico (Lipofectamina) e a porcentagem de ocorrência dos mecanismos de reparo celular (NHEJ e HDR) foi obtida por sequenciamento em larga escala. Os resultados evidenciaram que para a célula de linhagem (CFTE29o-) a ocorrência de *indels* variou entre 1,25% e 2,54% e o HDR 1,42%. Já no modelo iPSC, a prevalência nos mecanismos NHEJ e HDR foram de 12,13% e 2,38%, respectivamente. Os autores relatam que é necessário realizar uma seleção subsequente a edição de forma a melhorar os resultados obtidos e sugere o que a entrega do complexo ribonucleoproteico aumentaria a eficiência na edição.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos dos trabalhos de Lee et al., (2012) e Smirnikhina et al., (2020) em que a correção da mutação ocorreu em uma frequência muito baixa. As principais semelhanças encontradas no que tange ao desenho experimental foram utilizadas as células da linhagem CFBE que receberam os componentes do CRISPR/Cas9 em plasmídeo, usando o método de transfecção por Lipofectamina 3000, seguida da separação das células que receberam este plasmídeo por *sorting* e avaliação da correção por PCR. Por outro lado, os resultados de Vaidyanathan et al., (2020) e Ruan et al., (2019) apresentaram maior eficiência de edição, o que faz com que as

estratégias utilizadas para atingir o objetivo melhorando a eficiência de edição mereçam ser consideradas.

Ruan e colaboradores (2019) realizaram a correção da mutação F508del em um modelo de células-tronco pluripotente induzidas (iPSC). Para este fim, os autores utilizaram como estratégia a entrega do sistema CRISPR em ribonucleoproteína por eletroporação e realizando a modificação do sítio PAM do DNA doador. No trabalho os autores relatam cerca de 20% de eficiência na correção da mutação F508del sendo 18,4% heterozigotos e 3,6% homozigotos com o método empregado, além disso não foram encontrados *off-targets* nos alvos previstos *in silico*, mas os autores reconhecem a necessidade de sequenciar todo o genoma.

Ademais, o trabalho que apresentou o melhor resultado na correção da mutação F508del foi o de Vaidyanathan e colaboradores (2020). Os autores usaram modificações nos terminais 5' e 3' do sgRNA com 2-O-methyl-3-phosphorothioate (MS) e também utilizaram o vírus adenoassociado 6 (AAV6) para entrega do template (sequência de DNA usada como molde para o HDR) em um modelo de células-tronco basais de vias aéreas superiores (UABCs) isoladas de pacientes com fibrose cística. A entrega dos componentes do CRISPR, como complexo ribonucleoproteico, foi realizada por eletroporação com tampão OPTIMEM e inibidor da via de sinalização Rock para aumentar a sobrevivência e proliferação das células após a transfecção. Ainda, para melhorar a edição no desenho do DNA doador (template) foram adicionadas 8 mutações silenciosas, para mensurar o HDR e mudar o sítio PAM, impedindo novos cortes da Cas9 após a correção. Após 4 dias da transfecção, foi realizada PCR e sequenciamento, assim a quantidade de *indels* foi medida com o software TIDER e a ocorrência do HDR foi confirmada após clonagem do fragmento em plasmídeo seguido do sequenciamento e os resultados mostraram 31,5% de eventos de inserção e deleção (*indels*) e a sequência para correção foi observada em 41% ± 6% dos alelos. Os autores ainda verificaram se havia *off-targets* nos locais preditos *in silico* sendo encontrados 0,17% em um único locus, e também mostraram que as células corrigidas mantinham a capacidade de

diferenciação em epitélio, em testes usando membrana da submucosa do intestino delgado suíno.

Ao comparar os resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho com os publicados na literatura, alguns aspectos devem ser discutidos. Na primeira etapa do projeto, construção de ferramentas, as sequências de sgRNA foram determinadas e os *off-targets* preditos *in silico*, ainda, as sequências dos sgRNAs na ferramenta do plasmídeo foi verificada pelas metodologias de amplificação por PCR, digestão com enzima de restrição e sequenciamento e também, na ferramenta da ribonucleoproteína o complexo mostrou que o sgRNA consegue reconhecer a sequência do DNA e a proteína SaCas9 realiza a clivagem (experimento de clivagem *in vitro*). Os resultados são indicativos que as ferramentas construídas estariam funcionando. No que diz respeito à sequência do sgRNA, o trabalho de RUAN e colaboradores (2019) utilizou a mesma sequência do sgRNA 1637 e obteve uma frequência de *indels* de 5,5% a 12% em ensaio *in vitro*, as outras sequências não foram testadas em nenhum dos outros trabalhos. De maneira a melhorar a especificidade do sgRNA, este deveria ter uma sequência que reconhecesse apenas as células mutantes, ou seja, deveria estar bem em cima da mutação, que limitaria as possibilidades.

De maneira geral, mesmo os *off-targets* preditos *in silico*, por softwares específicos, os trabalhos não os encontraram em grande quantidade através de sequenciamento. Assim, pode-se presumir que os *off-targets* podem acontecer, mas que são eventos raros. Foram encontrados cerca de 0,17% de *off-targets* no trabalho de Vaidyanathan et al., 2020 que obteve a maior eficiência na correção da mutação F508del *in vitro*. Para confirmar se a estratégia é realmente segura para aplicação clínica, alguns autores sugerem que seja realizado o sequenciamento em larga escala de todo genoma (RUAN et al., 2019).

No que diz respeito a padronização da transfecção, o método por eletroporação apresenta melhores resultados (LIANG et al. 2014; MAURISSE et al., 2012), apesar dos experimentos realizados nesse trabalho apresentarem melhores resultados com Lipofectamina 3000 com a eficiência da transfecção em torno de 9%. A porcentagem de células que receberam o plasmídeo é considerada baixa, uma vez que para que o CRISPR funcione é necessário que,



além das células receberem a ferramenta, esta reconheça e clive o DNA alvo ativando o mecanismo de reparo, que apresenta frequência de 0,5% a 20% para o HDR (LINO et al., 2018). A associação de todas essas variáveis contribui para a baixa efetividade da técnica para a inserção de nucleotídeos via HDR (RICHARDSON et al., 2016), visto que o outro mecanismo de reparo (NHEJ) ocorre com uma frequência entre 20% e 60% mesmo na presença do DNA doador (LINO et al., 2018). Por outro lado, muitos trabalhos apresentaram melhores resultados de edição usando a entrega do complexo ribonucleoproteico (LIANG et al., 2015b; SHAPIRO et al., 2020; VAKULSKAS et al., 2018), sendo que ao comparar o mesmo desenho de sgRNA entregue por plasmídeo ou como RNA purificado, o último se mostra mais efetivo (LIANG et al., 2015b; RUAN et al., 2019).

Ademais, como perspectiva, a padronização da transfecção utilizando o complexo ribonucleoproteico deve ser realizada com algum marcador de seleção, por exemplo, proteína Cas9 fusionada a uma proteína fluorescente (GFP ou RFP). Por outro lado, ainda que o reagente lipídico, Lipofectamina 3000, apresentasse melhores resultados na transfecção do plasmídeo não foi realizada a padronização desta metodologia para a entrega do complexo. A proteína Cas9 sozinha é carregada positivamente e os oligonucleotídeos e o complexo Cas9:sgRNA apresentam carga negativa (LINO et al., 2018), o que mostra que esse método de entrega também pode ser aplicado ao complexo RNP. O mecanismo de ação da Lipofectamina faz com que a molécula de interesse, de carga negativa, seja englobada pelo reagente lipídico, formando uma única estrutura. A entrada desse complexo na célula se dá pela fusão com a membrana, pelo mecanismo de endocitose seguido de transporte passivo em vesículas através do movimento browniano, até o núcleo celular (CARDARELLI et al., 2016). Portanto, a estratégia de correção usando a ribonucleoproteína apresenta maior evidências de sucesso na literatura e pode ser aplicada no trabalho, entretanto, etapas anteriores como a padronização do método de transfecção devem ser realizadas a fim de se otimizar a aplicação da técnica e obter maior eficiência.

## 6 CONCLUSÕES

### Etapa 1:

- Com o uso dos softwares de predição é possível desenhar diferentes sgRNAs e prever alvos *off-targets* com base na sequência de DNA determinada.
- A construção da ferramenta de edição com a inserção da sequência de sgRNA no plasmídeo px458 foi realizada e confirmada pelas técnicas de PCR, digestão enzimática e sequenciamento por Sanger.
- A produção de sgRNA por reação de transcrição *in vitro* foi realizada com sucesso e quando complexado com a proteína SaCas9 forma um complexo ribonucleoproteico que reconhece e cliva a sequência de DNA alvo *in vitro* em diferentes proporções molares.
- Dentre as metodologias testadas, o melhor método para transfecção do plasmídeo px458 nas células de epitélio pulmonar (CFBE) é baseado no agente lipídico Lipofectamina 3000, com cerca de 9% de eficiência de entrega.

### Etapa 2:

- As concentrações das drogas, nocodazol e hidroxureia, que não afetam a viabilidade celular relativa em células de epitélio pulmonar (CFBE), pelo ensaio de vermelho neutro, são de 21,6 ng/mL e 46,80µg/mL respectivamente.
- Nas concentrações determinadas, após 24 horas de contato com a droga e mesmo período de recuperação, a droga hidroxureia sincroniza cerca de 60% das células na fase G2 no ciclo celular.

### Etapa 3:

- A sequência do primer que reconhece a célula selvagem apresenta especificidade e pode ser usada na detecção da correção da mutação por PCR em conjunto com outra metodologia de confirmação.
- A correção da mutação F508del no modelo de células de epitélio pulmonar (CFBE41o) pelas ferramentas desenvolvidas e metodologias utilizadas foi inferior a 12,5% ou nula.

- O estabelecimento de parâmetros de qualidade em linhagens celulares (cariotipagem, homogeneidade da população, confirmação das alterações genéticas específicas da linhagem, entre outros) é essencial para a otimização e qualidade dos trabalhos científicos.

## 7 PERSPECTIVAS

Os resultados e conclusões obtidos no presente trabalho possibilitam a enumeração das seguintes perspectivas:

- Trocar o modelo celular (célula da linhagem CFBE) por modelo de células-tronco, devido a problemas cromossômicos identificados nessa linhagem;
- Padronizar o método de transfecção do complexo ribonucleoproteico no modelo;
- Desenhar nova sequência de DNA doador (*template*) alterando a sequência PAM e com modificações químicas que facilitem a ocorrência do HDR;
- Padronizar a técnica para seleção e isolamento dos clones corrigidos;
- Verificar a presença da proteína CFTR após a correção.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da Biologia Celular**. 3° ed. Porto Alegre: ARTEMED, 2012.

ALTON, E. W. F. W. et al. Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 3, n. 9, p. 684–691, 2015.

ANGUELA, X. M.; HIGH, K. A. Entering the Modern Era of Gene Therapy. **Annual Review of Medicine**, v. 70, n. 1, p. 273–288, 2019.

ANVISA. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 338, DE 20 DE FEVEREIRO DE 2020**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-338-de-20-de-fevereiro-de-2020-244803291>. Acesso em: 30 jul. 2020.

ATHANAZIO, R. A. et al. Diretrizes brasileiras de diagnóstico e tratamento da fibrose cística. v. 43, n. 3, p. 219–245, 2017.

BAE, S.; PARK, J.; KIM, J. S. Cas-OFFinder: A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. **Bioinformatics**, v. 30, n. 10, p. 1473–1475, 2014.

BATES, D.; EASTMAN, A. Microtubule destabilising agents: far more than just antimetabolic anticancer drugs. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 83, n. 2, p. 255–268, 2017.

BOEL, A. et al. CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair by ssODNs in zebrafish induces complex mutational patterns resulting from genomic integration of repair-template fragments. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 11, n. 10, 2018.

BOLHASSANI, A.; KHAVARI, A.; ORAFA, Z. Electroporation – Advantages and Drawbacks for Delivery of Drug , Gene and Vaccine. 2014.

BRANZEI, D.; FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. v. 9, n. April, 2008.

BRUEGMANN, Tobias; DEECKE, Khira; FLADUNG, Matthias. Evaluating the efficiency of gRNAs in CRISPR/Cas9 mediated genome editing in poplars. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 15, p. 3623, 2019.

BULAKLAK, K.; GERSBACH, C. A. **The once and future gene therapy** *Nature Communications* Springer US, , 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-19505-2>>

CHU, V. T. et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 543–548, 2015.

CONCORDET, J.; HAEUSSLER, M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. **Nucleic Acids**

**Research**, v. 46, n. May, p. 487–496, 2018.

CONG, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819–823, 2013.

COONEY, A. L.; MCCRAY, P. B.; SINN, P. L. Cystic fibrosis gene therapy: Looking back, looking forward. **Genes**, v. 9, n. 11, 2018.

CUI, Y. et al. **Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools***Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* Springer Berlin Heidelberg, , 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12539-018-0298-z>>

CUTTING, G. R. **Cystic fibrosis genetics: From molecular understanding to clinical application***Nature Reviews Genetics* Nature Publishing Group, , 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg3849>>

DAMACENO. **Fibrose Cística**. Disponível em: <https://www.santacasasp.org.br/portal/site/pub/12784/fibrose-cistica>. Acesso em: 2 nov. 2020.

DEKKERS, J. F. et al. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 939–945, 2013.

DOENCH, J. G. et al. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 12, p. 1262–1267, 2014.

FAJAC, I.; GIRODON, E. Genomically-guided therapies : A new era for cystic fibrosis. **Archives de Pédiatrie**, v. 27, p. eS41–eS44, 2020.

FANEN, P.; WOHLHUTER-HADDAD, A.; HINZPETER, A. Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 52, p. 94–102, 2014.

FARRELL, Philip et al. Estimating the age of p.(Phe508del) with family studies of geographically distinct European populations and the early spread of cystic fibrosis. **European Journal of Human Genetics**, v. 26, n. 12, p. 1832-1839, 2018.

FIGUEREDO LAGO, J. E. et al. A simple, fast and inexpensive method for mutation scanning of CFTR gene. **BMC Medical Genetics**, v. 18, n. 1, p. 1–7, 2017.

FIRTH, A. L. et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs Report Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. **CellReports**, v. 12, n. 9, p. 1385–1390, 2015.

FROUX, L. et al. Short-term consequences of F508del-CFTR thermal instability on CFTR-dependent transepithelial currents in human airway epithelial cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

GADSBY, C. D.; VERGANI, P.; CSANÁDY, L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. **Nature**, v. 440, p. 447–483, 2006.

GELFOND, D.; BOROWITZ, D. Gastrointestinal Complications of Cystic Fibrosis. **CLINICAL GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY**, v. 11, n. 4, p. 333–342, 2013.

GHARAATI-FAR, N. et al. Efficiency and cytotoxicity analysis of cationic lipids-mediated gene transfection into AGS gastric cancer cells. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, n. 5, p. 1001–1008, 2018.

GRIESENBACH, U.; PYTEL, K. M.; ALTON, E. W. F. W. Cystic Fibrosis Gene Therapy in the UK and Elsewhere. **Human Gene Therapy**, v. 26, n. 5, p. 266–275, 2015.

GRUENERT, D. C. et al. Established cell lines used in cystic fibrosis research. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 3, n. SUPPL. 2, p. 191–196, 2004.

GUAN, S. et al. Self-assembled peptide–poloxamine nanoparticles enable in vitro and in vivo genome restoration for cystic fibrosis. **Nature Nanotechnology**, v. 14, n. 3, p. 287–297, 2019.

GUO, P. et al. Liposome Lipid-Based Formulation Has the Least Influence on rAAV Transduction Compared to Other Transfection Agents. **Molecular Therapy: Methods & Clinical Development**, v. 9, n. June, p. 367–375, 2018.

HAN, X. et al. CRISPR-Cas9 delivery to hard-to-transfect cells via membrane deformation. n. August, p. 1–9, 2015.

HARRISON, C. First CRISPR therapy dosed. **Nature biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 379–381, 2020.

HODGES, C. A.; CONLON, R. A. ScienceDirect Delivering on the promise of gene editing for cystic fibrosis. **Genes & Diseases**, v. 6, n. 2, p. 97–108, 2019.

HORNSTEIN, B. D. et al. Effects of Circular DNA Length on Transfection Efficiency by Electroporation into HeLa Cells. **PLoS ONE**, p. 1–17, 2016.

HU, Z. et al. Ligase IV inhibitor SCR7 enhances gene editing directed by CRISPR-Cas9 and ssODN in human cancer cells. **Cell and Bioscience**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.

HWANG, T. C. et al. Structural mechanisms of CFTR function and dysfunction. v. 150, n. 4, p. 539–570, 2018.

I et al. We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. **Intech**, v. i, n. tourism, p. 13, 2012.

INTELLIA. **Intellia Therapeutics - In Vivo Therapies**. Disponível em: <https://www.intelliatx.com/our-pipeline/>. Acesso em: 2 jan. 2021.

JO, D. H. et al. CRISPR-Cas9–mediated therapeutic editing of Rpe65 ameliorates the disease phenotypes in a mouse model of Leber congenital amaurosis. **Science Advances**, v. 5, n. 10, p. 1–10, 2019.

KEREM, Bat-sheva et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. **Science**, v. 245, n. 4922, p. 1073-1080, 1989.

KIM, J. M. et al. Genotyping with CRISPR-Cas-derived RNA-guided

- endonucleases. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–8, 2014.
- LABUN, K. et al. CHOPCHOP v3 : expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing H akon. v. 47, n. May, p. 171–174, 2019.
- LATTANZI, A. et al. Optimization of CRISPR/Cas9 Delivery to Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells for Therapeutic Genomic Rearrangements. **Molecular Therapy**, v. 27, n. 1, p. 137–150, 2019.
- LESUEUR, L. L.; MIR, L. M.; ANDRÉ, F. M. Overcoming the Specific Toxicity of Large Plasmids Electrotransfer in Primary Cells In Vitro. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 5, n. March, p. e291, 2016.
- LIANG, X. et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. **Journal of Biotechnology**, v. 208, p. 44–53, 2015a.
- LIANG, X. et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. **Journal of Biotechnology**, v. 208, p. 44–53, 2015b.
- LIN, J. et al. The role of il-7 in immunity and cancer. **Anticancer Research**, v. 37, n. 3, p. 963–967, 2017.
- LIN, S. et al. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. **eLife**, v. 3, p. e04766, 2014.
- LINO, C. A. et al. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. **Drug Delivery**, v. 25, n. 1, p. 1234–1257, 2018.
- LIU, C. et al. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. **Journal of Controlled Release**, v. 266, n. September, p. 17–26, 2017.
- LONG, S.; BERKEMEIER, B. Maximizing viral detection with SIV droplet digital PCR (ddPCR) assays. **PLoS ONE**, v. 15, n. 5, p. 1–20, 2020.
- LOPES-PACHECO, M. CFTR modulators: Shedding light on precision medicine for cystic fibrosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. SEP, p. 1–20, 2016.
- LOPES-PACHECO, M. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. February, p. 1–29, 2020.
- LUKACS, G. et al. Biochemical methods to assess CFTR expression and membrane localization. v. 3, p. 73–77, 2004.
- LYNCH, J. P. et al. Lung Transplantation for Cystic Fibrosis: Results, Indications, Complications, and Controversies. **Semin Respir Crit Care Med.**, v. 176, n. 1, p. 299–320, 2015.
- MAEDER, M. L. et al. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. **Nature Medicine**, v. 25, n. 2, p. 229–233, 2019.
- MARUYAMA, T. et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 538–542, 2015.



MAURISSE, R. et al. Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. **BMC Biotechnology**, v. 10, p. 1–9, 2010.

MEDEIROS, L. C. S. et al. Rapid, Selection-Free, High-Efficiency Genome Editing in Protozoan Parasites Using CRISPR-Cas9 Ribonucleoproteins. **American Society for Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 1–15, 2017.

MEEGEN, M. A. VAN. **CFTR protein expression in human primary cells**. [s.l.: s.n.].

MEEGEN, M. A. VAN et al. CFTR-mutation specific applications of CFTR-directed monoclonal antibodies. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 12, n. 5, p. 487–496, 2013a.

MEEGEN, M. A. VAN et al. Apical CFTR Expression in Human Nasal Epithelium Correlates with Lung Disease in Cystic Fibrosis. v. 8, n. 3, 2013b.

MIRTAJANI, S. B. et al. Geographical Distribution of Cystic Fibrosis ; The past 70 Years of Data Analyzis. p. 105–112, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Os desafios do atendimento às doenças raras**. Disponível em: <http://www.iff.fiocruz.br/index.php/8-noticias/268-desafiosdoencasraras>. Acesso em: 20 dez. 2020.

MIYAOKA, Y. et al. Isolation of single-base genome-edited human iPS cells without antibiotic selection Supplementary Figure 9. [s.d.].

NCT00004471. **Phase I Pilot Study of Gene Therapy for Cystic Fibrosis Using Cationic Liposome Mediated Gene Transfer**. Disponível em: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00004471?cond=NCT00004471&draw=2&rank=1>. Acesso em: 24 dez. 2020.

NCT02866721 . **Safety and Tolerability Study of Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Infusion in Adults With Cystic Fibrosis (CEASE-CF)**. Disponível em: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02866721?cond=NCT02866721&draw=2&rank=1>. Acesso em: 29 dez. 2020.

NCT04601051. **Study to Evaluate Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of NTLA-2001 in Patients With Hereditary Transthyretin Amyloidosis With Polyneuropathy (ATTRv-PN)**. Disponível em: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04601051?cond=NCT04601051&draw=2&rank=1>. Acesso em: 1 jan. 2021.

NCT03872479 . **Single Ascending Dose Study in Participants With LCA10**. Disponível em: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03872479?cond=NCT03872479&draw=2&rank=1>. Acesso em: 2 jan. 2021.

NETO, N. L. **Fibrose Cística Enfoque Multidisciplinar**. [s.l.: s.n.].

ORENSTEIN, D. M.; ABOOD, R. N. Cost(s) of caring for patients with cystic fibrosis. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 30, n. 3, p. 393–398, 2018.

ORKIN, S. H.; REILLY, P. Paying for future success in gene therapy. **Science**, v. 352, n. 6289, p. 1059–1061, 2016.

ORPHANET . **Portal de doenças raras**. Disponível em: <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>. Acesso em: 21 dez. 2020.

PAGIN, A.; SERMET-GAUDELUS, I.; BURGEL, P. Genetic diagnosis in practice : From cystic fibrosis to CFTR-related disorders. **Archives de Pédiatrie**, v. 27, p. eS25–eS29, 2020.

PARK, H. et al. Valproic Acid Significantly Improves CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1–13, 2020.

PENG, D. et al. CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in *Trypanosoma cruzi*. **mBio**, v. 6, n. 1, p. e02097-14, 2015.

PERONE, C. et al. Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 2, p. 134–138, 2010.

PESCE, E. et al. Evaluation of a systems biology approach to identify pharmacological correctors of the mutant CFTR chloride channel. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 15, n. 4, p. 425–435, 2016.

PINTO, M. et al. Cuidado complexo , custo elevado e perda de renda : o que não é raro para as famílias de crianças e adolescentes com condições de saúde raras Complex care , high cost , and loss of income : frequent issues for families of children and adolescents with rar. v. 35, n. 9, p. 1–13, 2019.

PROESMANS, M.; VERMEULEN, F.; DE BOECK, K. What's new in cystic fibrosis? from treating symptoms to correction of the basic defect. **European Journal of Pediatrics**, v. 167, n. 8, p. 839–849, 2008.

RAMAMOORTH, M.; NARVEKAR, A. Non viral vectors in gene therapy - An overview. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 1, p. GE01–GE06, 2015.

RAMLEE, M. K. et al. High-throughput genotyping of CRISPR/Cas9-mediated mutants using fluorescent PCR-capillary gel electrophoresis. **Scientific Reports**, v. 5, n. May, p. 1–13, 2015.

RATJEN, F. et al. Cystic fibrosis. **Nature Publishing Group**, n. May, p. 1–19, 2015.

**REBRAFC. Grupo Brasileiro de Estudos em Fibrose Cística (2017)**. Disponível em: <http://portalgbefc.org.br/site/pagina.php?idpai=128&id=15>. Acesso em: 1 dez. 2020.

REDMAN, M. et al. What is CRISPR/Cas9? **Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition**, v. 101, n. 4, p. 213–215, 2016.

REES, H. A. et al. protein delivery. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–10, 2017.

- RICHARDSON, C. D. et al. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. v. 34, n. 3, 2016.
- RIESENBERG, S.; MARICIC, T. Targeting repair pathways with small molecules increases precise genome editing in pluripotent stem cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2018.
- RIORDAN, J. R. et al. Identification the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of. **Science**, v. 245, 1989.
- RIQUENA, B. et al. Contaminação microbiológica de nebulizadores usados por pacientes com fibrose cística: um problema subestimado. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 45, n. 3, p. e20170351–e20170351, 2019.
- ROCHE, P. J. R. et al. Homology Directed Repair by Cas9: Donor Co-localization in Mammalian Cells. **bioRxiv**, p. 248179, 2018.
- RODENAS-CUADRADO, P.; HO, J.; VERNES, S. C. Shining a light on CNTNAP2: Complex functions to complex disorders. **European Journal of Human Genetics**, v. 22, n. 2, p. 171–178, 2014.
- ROGERS, C. S. et al. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. **Science**, v. 321, n. 5897, p. 1837–1841, 2008.
- ROSA, F. R. et al. Fibrose cística: Uma abordagem clínica e nutricional. **Revista de Nutricao**, v. 21, n. 6, p. 725–737, 2008.
- ROSA, K. M. da et al. Genetic and phenotypic traits of children and adolescents with cystic fibrosis in Southern Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 6, p. 498-504, 2018.
- RUAN, J. et al. Efficient Gene Editing at Major CFTR Mutation Loci. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 16, n. June, p. 73–81, 2019.
- RUBIN, J. L. et al. Frequency and costs of pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis in the United States. **Current Medical Research and Opinion**, v. 33, n. 4, p. 667–674, 2017.
- SANDERS, D. B.; FINK, A. Background and Epidemiology. **Pediatr Clin North Am. Author**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2016.
- SCHNEIDER-FUTSCHIK, E. K. Beyond cystic fibrosis transmembrane conductance regulator therapy: a perspective on gene therapy and small molecule treatment for cystic fibrosis. **Gene Therapy**, v. 26, n. 9, p. 354–362, 2019.
- SCHWANK, G. et al. in Intestinal Stem Cell Organoids Supplemental Figure 1. v. 13, [s.d.].
- SCOTET, V.; L'HOSTIS, C.; FÉREC, C. The changing epidemiology of cystic fibrosis: Incidence, survival and impact of the CFTR Gene discovery. **Genes**, v. 11, n. 6, 2020.
- SERRANO, R. T. **Detecção de mutações no gene cftr em pacientes com suspeita de fibrose cística.** [s.l: s.n.].

SHAPIRO, J. et al. Increasing CRISPR Efficiency and Measuring Its Specificity in HSPCs Using a Clinically Relevant System. **Molecular Therapy: Methods & Clinical Development**, v. 17, n. June, p. 1097–1107, 2020.

SILVA, A. C. R.; BARBOSA JÚNIOR, J. Realidades e perspectivas do uso de terapia gênica no tratamento de doenças. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 20, n. 3, p. 122–127, 2018.

SINGH, A.; XU, Y. J. The cell killing mechanisms of hydroxyurea. **Genes**, v. 7, n. 11, 2016.

SIQUEIRA, P. R. DE. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À NANOPARTÍCULA DE DIÓXIDO DE TITÂNIO EM HEPATÓCITOS DE PEIXE ZEBRA (*Danio rerio*, Hamilton, 1822). UMA ABORDAGEM IN VITRO. 2016.

SMIRNIKHINA, S. A. et al. P.F508del editing in cells from cystic fibrosis patients. **PLoS ONE**, v. 208, p. 44–53, 2020.

SONG, J. et al. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. **Nature Communications**, v. 7, 2016.

THOMAS, H. R. et al. High-throughput genome editing and phenotyping facilitated by high resolution melting curve analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, 2014.

THOMAS, PHILIP J. *et al.* **COMPOSIÇÕES PARA A ENTREGA DE RNAT COMO NANOPARTÍCULAS E MÉTODOS DE USO**. Depositante: The board of regents of the University of Texas system (US). Titular: Philip J. Thomas / Daniel J. Siegwart / Arthur E. Johnson / Michael J. Torres / Jason B. Miller. Procurador: Daniel Advogados (Alt.de Daniel & Cia). BR 11 2018 073671 6 A2. Depósito: 16 maio 2017. Concessão: 26 fev. 2019.

TOUSSON, A. et al. Characterization of CFTR expression and chloride channel activity in human endothelia. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 275, n. 6 44-6, p. 1555–1564, 1998.

TRAN, N. et al. Enhancement of Precise Gene Editing by the Association of Cas9 With Homologous Recombination Factors. v. 10, n. April, p. 1–13, 2019.

ULIYAKINA, I. et al. Full Rescue of F508del - CFTR Processing and Function by CFTR Modulators can be Achieved by Removal of Two Unique Regulatory Regions . 2018.

UMKEHRER, C. et al. Isolating live cell clones from barcoded populations using CRISPRa-inducible reporters. **Nature Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 1–16, 2020.

VAIDYANATHAN, S. et al. High-Efficiency, Selection-free Gene Repair in Airway Stem Cells from Cystic Fibrosis Patients Rescues CFTR Function in Differentiated Epithelia. **Cell Stem Cell**, v. 26, n. 2, p. 161- 171.e4, 2020.

VAKULSKAS, C. A. et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. **Nature Medicine**, v. 24, n. 8, p. 1216–1224, 2018.

VALÉCIO, M. **Medicamento mais caro do mundo agora no Brasil** . Disponível em: <https://www.ictq.com.br/assuntos-regulatorios/1924-medicamento-mais-car-do-mundo-agora-no-brasil>. Acesso em: 23 dez. 2020

- VANDEVANTER, D. R. et al. Cystic fibrosis in young children: A review of disease manifestation, progression, and response to early treatment. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 15, n. 2, p. 147–157, 2016.
- VEIT, G. et al. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: Expanded classification of cystic fibrosis mutations. **Molecular Biology of the Cell**, v. 27, n. 3, p. 424–433, 2016.
- WALKER, J. M. Cystic Fibrosis: Diagnosis and Protocols. v. 2, p. 1–16, 2011.
- WALTZ, E. With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. **Nature biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 6–7, 2018.
- WANG, H.; LA RUSSA, M.; QI, L. S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, n. 1, p. 227–264, 2016.
- WANG, Y. et al. Efficient Human Genome Editing Using SaCas9 Ribonucleoprotein Complexes. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 7, 2019.
- WHITE, W. A rare disease patient/caregiver perspective on fair pricing and access to gene-based therapies. **Gene Therapy**, p. 9–11, 2019.
- XU, H. et al. Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design. p. 1147–1157, 2015.
- YANG, D. et al. Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–15, 2016.
- YANG, L. et al. CRISPR / Cas9-Directed Genome Editing of Cultured Cells. n. July, p. 1–17, 2014.
- YANOVSKY-DAGAN, S. et al. Stem Cell Reports. **Stem Cell Reports**, v. 5, n. 2, p. 221–231, 2015.
- YEH, C. D.; RICHARDSON, C. D.; CORN, J. E. Advances in genome editing through control of DNA repair pathways. **Nature Cell Biology**, v. 21, n. 12, p. 1468–1478, 2019.
- YIANGOU, L. et al. Method to Synchronize Cell Cycle of Human Pluripotent Stem Cells without Affecting Their Fundamental Characteristics. **Stem Cell Reports**, v. 12, n. 1, p. 165–179, 2019.
- YOSEF, I.; QIMRON, U. How bacteria get spacers from invaders Black carbon and. **Nature News & Views**, v. 519, p. 166–167, 2015.
- ZHANG, J. P. et al. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2017a.
- ZHANG, L. et al. Lipid nanoparticle-mediated efficient delivery of CRISPR / Cas9 for tumor therapy. **Nature Publishing Group**, n. 11, p. 3–10, 2017b.

## **ANEXOS**

### **ANEXO A**

Trabalho publicado na revista Visão Acadêmica (UFPR) edição especial de Fibrose Cística vol.20 N° 3.1 (Jul./Set 2019) - ISSN: 1518-8361

96

---

## **AS FERRAMENTAS DE EDIÇÃO GENÉTICA NA FIBROSE CÍSTICA**

### **GENETIC EDITING TOOLS IN CYSTIC FIBROSIS**

**Letícia Werzel Bassai<sup>1</sup>, Jhonatan Basso Lino<sup>1</sup>, Patrícia Shigunov<sup>1</sup>**

1 - Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco - Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ - PARANÁ)

Autora correspondente: [patricia.shigunov@fiocruz.br](mailto:patricia.shigunov@fiocruz.br)

#### **RESUMO**

A fibrose cística é uma doença genética causada por mutações no gene CFTR, não tem cura e causa obstruções nas vias aéreas do pulmão e nos ductos pancreáticos. O objetivo desta revisão é discutir os estudos de correção do gene CFTR utilizando três ferramentas de edição genética: CRISPR/Cas9, Zinc-Finger e TALEN. Todas essas estratégias envolvem a clivagem de uma região específica do DNA, geralmente uma região próxima à mutação. Após a clivagem, a célula ativa a maquinaria de reparo por homologia e utiliza como molde o DNA doador contendo a sequência correta. As técnicas apresentam capacidade de correção das mutações, porém ainda possuem baixa eficiência e podem causar efeitos adversos em outras regiões do DNA. Dessa forma, mais estudos são necessários a fim de tornar essas técnicas mais eficientes e seguras para aplicações futuras em terapias gênicas.

**Palavras chave:** CFTR, CRISPR/Cas9, TALENs, Zinc-finger, fibrose cística

#### **ABSTRACT**

## ANEXO B



ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA  
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
NÚCLEO DE TECNOLOGIA CELULAR

**PUCPR**

### CITOGENÉTICA TÉCNICA: CARIOTIPAGEM COM BANDEAMENTO GTG

IDENTIFICAÇÃO: CFBE 508 del#20

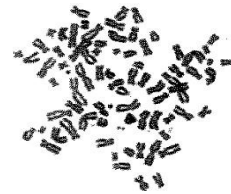
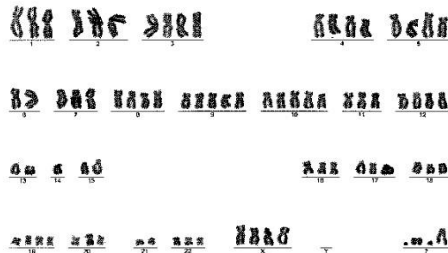
MATERIAL: Célula de linhagem do epitélio pulmonar homozigota F508del de fibrose cística

DATA DA COLHEITA: 11/11/2020

SOLICITANTE: Letícia Werzel Bassai

**RESULTADO:** Quinze metáfases foram completamente analisadas e o número de cromossomos variou de 41 a 78 cromossomos. Devido à quantidade de cromossomos, a reolucção ficou baixa impedindo a análise correta. Por esta razão o resultado será descritivo. Foi observada na célula abaixo, a presença de double minutes, que significa amplificação gênica, além de cromossomos marcadores. Em outra célula houve a suspeita de uma translocação t(4;11) e um derivativo do cromossomo X. Algumas células apresentaram quebras, outras cromossomos marcadores diferentes.

CARIOGRAMA REPRESENTATIVO DA AMOSTRA



CÓDIGO: ME372

DATA DO LAUDO: 02/12/2020

ANALISTAS: Isadora May Vaz e Valderez Ravaglio

REVISOR: Valderez Ravaglio Jamur

SUPERVISOR:

  
Valderez Ravaglio Jamur  
CITOGENETICISTA  
CRF9 1752