

Mariele Santos Moraes-Almeida
Henrique César Jesus-Ferreira
Camila Leal-Lopes
Ana Claudia Oliveira Carreira
Mari Cleide Sogayar
Raquel Arminda Carvalho Machado

EDIÇÃO GÊNICA POR CRISPR/CAS9

Da teoria à prática



Blucher Open Access


MEDICINA
USP

 Universidade de São Paulo
Instituto de Química

 **nucel**

EDIÇÃO GÊNICA POR CRISPR/CAS9

da Teoria à Prática

CONSELHO EDITORIAL

André Costa e Silva

Cecilia Consolo

Dijon de Moraes

Jarbas Vargas Nascimento

Luis Barbosa Cortez

Marco Aurélio Cremasco

Rogerio Lerner



MARI CLEIDE SOGAYAR
RAQUEL ARMINDA CARVALHO MACHADO
(coordenadoras)

EDIÇÃO GÊNICA POR CRISPR/CAS9 da Teoria à Prática

AUTORES PRINCIPAIS

Mariele Santos Moraes-Almeida | Henrique César Jesus-Ferreira

AUTORAS CORRESPONDENTES

Mari Cleide Sogayar | Raquel Arminda Carvalho Machado

DEMAIS AUTORAS

Camila Leal-Lopes | Ana Claudia Oliveira Carreira

2022

Edição Gênica por CRISPR/Cas9: da Teoria à Prática

© 2022 Mari Cleide Sogayar e Raquel Arminda Carvalho Machado (coordenadoras)
Editora Edgard Blücher Ltda.

Publisher Edgard Blücher

Editor Eduardo Blücher

Coordenação editorial Jonatas Eliakim

Produção editorial Kedma Marques

Diagramação e capa Laércio Flenic

Revisão de texto Samira Panini

Imagem da capa iStockphoto

Blucher

Rua Pedroso Alvarenga, 1245, 4º andar
04531-934 – São Paulo – SP – Brasil
Tel 55 11 3078-5366
contato@blucher.com.br
www.blucher.com.br

Segundo Novo Acordo Ortográfico, conforme 5. ed.
do Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa,
Academia Brasileira de Letras, março de 2009.

É proibida a reprodução total ou parcial por quaisquer
meios, sem autorização escrita da Editora.

Todos os direitos reservados pela Editora
Edgard Blücher Ltda.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Angélica Ilacqua CRB-8/7057

Edição gênica por CRISPR : CAS9 da teoria à prática /
coordenado por Mari Cleide Sogayar, Raquel Arminda Carvalho
Machado; autores principais: Mariele Santos Moraes-Almeida,
Henrique César Jesus-Ferreira; autora correspondente: Raquel
Arminda Carvalho Machado; demais autoras: Camila Leal-Lopes,
Ana Claudia Oliveira Carreira. - São Paulo : Blucher, 2022.

78 p. : il.

Open access

Bibliografia

ISBN 978-65-5550-126-1 (impresso)

ISBN 978-65-5550-127-8 (eletrônico)

1. Genética 2. Biologia molecular I. Sogayar, Mari Cleide II.
Machado, Raquel Arminda III. Moraes-Almeida, Mariele Santos
IV. Jesus-Ferreira, Henrique César V. Machado, Raquel Arminda
Carvalho VI. Leal-Lopes, Camila VII. Carreira, Ana Claudia Oliveira

22-1296

CDD 572.8

Índices para catálogo sistemático:

1. Genética

PREFÁCIO

Este livro surgiu a partir de uma atividade do nosso grupo de pesquisa durante o Curso Avançado de Inverno, realizado em 2019, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, para o qual nós nos comprometemos a montar um módulo de treinamento teórico e prático sobre a tecnologia de Edição Gênica CRISPR/Cas9, a qual havia sido implementada em nosso laboratório pelo Dr. Carlos DeOcesano-Pereira e a Dr^a. Raquel A. C. Machado e que vem sendo utilizada, desde então, em diversos projetos de pesquisa.

Como o treinamento envolvia alunos de Pós-graduação de outros estados do país e de diferentes níveis de conhecimento sobre as tecnologias de Biologia Molecular e Engenharia Genética, a então mestranda Mariele de Almeida e o doutorando Henrique Cesar de Jesus Ferreira elaboraram um Roteiro dos Experimentos contendo as bases teóricas e detalhando os procedimentos práticos da tecnologia. Dessa iniciativa, surgiu um Manual que foi extremamente útil para o treinamento do grupo participante de alunos.

A importância crescente da Edição Gênica tanto na pesquisa básica como na terapêutica de diversas doenças, a ponto de se tornar o motivo da premiação do Nobel de Química em 2020 às duas pesquisadoras que mais contribuíram

para o estabelecimento da tecnologia de CRISPR/Cas9 (Emmanuele Charpentier e Jennifer Doudna), nos motivaram a transformar o Manual utilizado no Curso de Inverno num material que pudesse ser utilizado por qualquer pessoa que desejasse utilizar esta tecnologia. Outros membros do nosso grupo de pesquisa aderiram então à desafiante tarefa de transformar o Manual original num livro, com utilidade mais ampla. O resultado desse esforço é aqui apresentado, esperando que possa instrumentar pós-graduandos e professores na utilização da Edição Gênica para estudos de Genômica Funcional.

Portanto, é com grande satisfação e orgulho que apresentamos aqui o resultado do esforço conjunto de um grupo de pesquisadores que não pouparam esforços para compartilhar generosamente seus conhecimentos.

Agradecemos o papel pioneiro do Dr. Carlos DeOcesano-Pereira no estabelecimento da tecnologia em nosso laboratório e o apoio irrestrito do Departamento de Bioquímica, da Comissão de Coordenação do Programa de Bioquímica (CCP-Bioq) e da Comissão de Pós-graduação (CPG) do Instituto de Química da USP e as agências de fomento que apoiam nossas iniciativas de Ensino, Pesquisa e Inovação (BNDES, CAPES, CNPq, FAPESP, FINEP, MS-DECIT e MCTI).

LISTA DE ABREVIATURAS

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
CFU	Unidades formadoras de colônias (<i>colony-forming units</i>)
CRISPR	Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>)
crRNA	RNA CRISPR
CTNBio	Comissão técnica nacional de biossegurança
ddNTP	Didesoxinucleotídeos
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dNTP	Desoxinucleotídeos
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>Green fluorescent protein</i>)
gRNA	RNA-guia

HR	Recombinação homóloga (<i>Homologous recombination</i>)
KI	<i>Knock-in</i>
KRAB	<i>Krueppel-associated box</i>
LSD1	<i>Lysine-specific methylase 1</i>
M.O.I	Multiplicidade de infecção (<i>Multiplicity of infection</i>)
mRNA	RNA mensageiro
NB2	Nível de biossegurança 2
NCBI	Centro Nacional de informação biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NHEJ	Junção de extremidades não homólogas (<i>Non-homologous end joining</i>)
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
PBSA	Tampão salina fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA (<i>RNA interfering silencing complex</i>)
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
shRNA	Pequenos grampos de RNA (<i>Short hairpin RNA</i>)
SID	<i>SIN3-interaction domain</i>
siRNA	Pequeno RNA de interferência (<i>Small interfering RNA</i>)
SNP	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
TALENs	Nucleases com efetores do tipo ativador transcricional (<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>)
TIDE	<i>Tracking of indels by decompositions</i>
tracrRNA	RNA CRISPR transativador (<i>Transactivating CRISPR RNA</i>)
ZFNs	Nucleases de dedo de zinco (<i>Zinc finger nucleases</i>)

SUMÁRIO

SILENCIAMENTO E EDIÇÃO GÊNICA	11
SISTEMA DE EDIÇÃO GÊNICA CRISPR/CAS9	15
HISTÓRICO.....	15
CLASSIFICAÇÃO E MECANISMO.....	16
FORMAS ADAPTADAS DA ENZIMA CAS9.....	20
APLICAÇÕES DO SISTEMA CRISPR/CAS9.....	21
ETAPA 1 – INÍCIO DA EDIÇÃO GÊNICA: ESCOLHA DO ALVO, DA ESTRATÉGIA DE EDIÇÃO GÊNICA E DESENHO DOS RNAS GUIAS (GRNAS).....	27
PROTOCOLO 1	30
ETAPA 2 – PRODUÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES: DIGESTÃO E DESFOSFORILAÇÃO DO PLASMÍDEO, ANELAMENTO E FOSFORILAÇÃO DOS RNAS GUIAS E REAÇÃO DE LIGAÇÃO AO VETOR.....	31
PROTOCOLO 2	37
ETAPA 3 – MINIPREPARAÇÃO DE DNA DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES: ELETROPORAÇÃO DE BACTÉRIAS, MINIPREPARAÇÃO BACTERIANA E DIGESTÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES	41
PROTOCOLO 3	45
ETAPA 4 – CONFIRMAÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE: PREPARO DE AMOSTRAS DE DNA PLASMÍDEAL PARA SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS CROMATOGRAMAS	47
PROTOCOLO 4	49
ETAPA 5 – GERAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES NOCAUTEADAS: TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS 293T, TITULAÇÃO VIRAL, CÁLCULO DA MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO (M.O.I) E TRANSDUÇÃO DA CÉLULA-ALVO ...	51
PROTOCOLO 5	55

**ETAPA 6 – CONFIRMAÇÃO DA EDIÇÃO GÊNICA (NOCAUTEAMENTO): ENSAIO
SURVEYOR, ENSAIO POR TIDE, PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QRT-PCR),
PCR GENÔMICO, WESTERN-BLOTTING E SEQUENCIAMENTO DE SANGER 59**

PROTOCOLO 6..... 63

REFERÊNCIAS..... 71

AUTORES 77

SILENCIAMENTO E EDIÇÃO GÊNICA

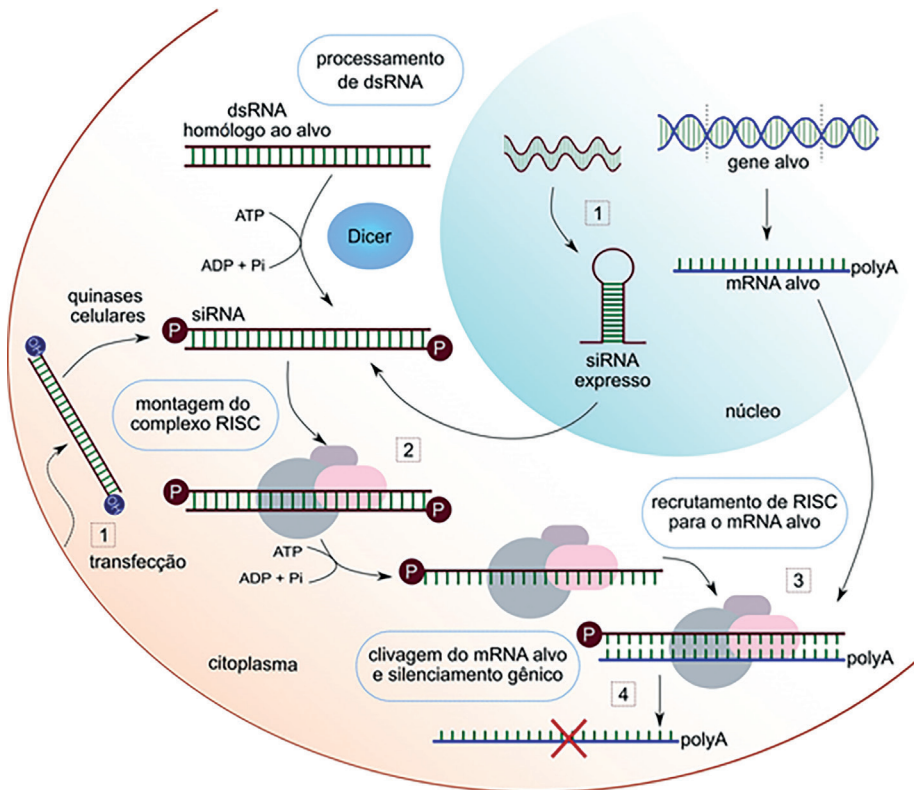
O silenciamento e a edição gênica são duas ferramentas promissoras da Biologia Molecular que têm se tornado cada vez mais importantes no estudo da Genômica Funcional.

O silenciamento de genes atua ao nível do RNA mensageiro (mRNA), podendo ser transitório ou estável, dependendo do tipo de molécula que está sendo utilizada. O silenciamento transitório é geralmente mediado por *small interfering RNAs* (siRNAs), os quais ligam-se ao mRNA alvo, e com a ajuda do complexo enzimático RISC, ocasionam sua degradação e, consequentemente, inibem a expressão de determinado gene, visto que o processo de tradução não ocorrerá (Figura 1). Por outro lado, o silenciamento estável geralmente utiliza, como ferramenta, *short hairpin RNAs* (shRNAs), os quais são geralmente codificados por vetores de DNA e introduzidos nas células por meio de transfecção plasmideal ou transdução viral. Os vetores de DNA carregam a informação do transcrito, bem como marcas de seleção (ex: cassetes de resistência a antibióticos e/ou marcadores fluorescentes), utilizadas

para permitir a eliminação, com sucesso, de células que não foram transfectadas ou transduzidas e a manutenção das células que apresentam a inibição estável do gene-alvo.

Por outro lado, a edição de genes é um tipo de Engenharia Genética em que trechos de DNA podem ser inseridos, modificados, excluídos ou substituídos no genoma de um organismo. Ao contrário dos métodos tradicionais, que inserem material genético aleatoriamente no genoma de um hospedeiro, as tecnologias atuais de edição de genes alteram regiões específicas do genoma. Nucleases de Dedo de Zinco (ZFNs), Nucleases com Efetores do Tipo Ativador Transcricional (TALENs) e Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR) são as três tecnologias mais atuais e comuns na edição de genes. Essas tecnologias têm sido amplamente utilizadas na Engenharia Genética e funcionam induzindo quebras no DNA, as quais podem estimular mecanismos de reparo propensos a erros, como a via de junção de extremidades não homóloga (NHEJ), ou mecanismos altamente eficientes, como a via de reparo direcionado por homologia (HDR). Essas ferramentas apresentam um enorme potencial de aplicação nas mais diversas áreas do conhecimento, podendo, por exemplo, ser utilizadas no estabelecimento de linhagens e animais transgênicos, na descoberta de novas drogas e até mesmo na terapia gênica.

Abordaremos aqui, de forma detalhada, o sistema de edição gênica denominado CRISPR/Cas9, uma técnica já bem estabelecida em nosso grupo de pesquisa. Esperamos que o compartilhamento desses conhecimentos possa servir como base para diversos pesquisadores no desenvolvimento de novos projetos de pesquisa nas mais diversas áreas do conhecimento.

Figura 1: Mecanismo de ação do RNA de interferência.

1- RNA de dupla fita é inserido na célula através de transfecção ou por expressão de algum vetor; 2- Dentro da célula, por processos enzimáticos, a dupla fita de RNA se torna fita simples; 3- O pequeno RNA de interferência (*small interfering RNA*, ou simplesmente siRNA) destrói o RNA mensageiro (mRNA), com a ajuda de um complexo enzimático conhecido como *RNA interfering silencing complex* (RISC); 4- O RNA mensageiro é degradado e o gene-alvo deixa de ser expresso pela célula.

SISTEMA DE EDIÇÃO GÊNICA CRISPR/CAS9

HISTÓRICO

A descrição do locus CRISPR (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*, originando o acrônimo CRISPR), ocorreu, pela primeira vez, em 1987, por Ishino e colaboradores, quando estudavam o gene *iap*, que atua na interconversão de isoenzimas da fosfatase alcalina, em *E. coli*. Naquela época, com dados insuficientes da sequência do DNA e com tecnologias não tão avançadas como as que possuímos nos dias atuais, não foi possível aos pesquisadores prever a função biológica daquelas sequências. Em 1993, o locus CRISPR foi também observado em Archaea (*Haloferax mediterranei*) e, em seguida, foi identificado no genoma de muitas outras bactérias. A conservação do mesmo locus em dois domínios da vida foi um indicativo de que, muito provavelmente, esta região possuía alguma importância. Porém, foi somente em 2005 que, de forma independente, Mojica e colaboradores, assim como Pourcel e colaboradores, reportaram que as sequências contidas nos espaçadores eram homólogas às sequências encontradas em bacteriófagos, pró-fagos e plasmídeos. Dessa maneira, demonstrou-se que organismos exógenos não eram capazes de infectar bactérias que possuíam, em seu locus CRISPR, sequências espaçadoras homólogas a

trechos do DNA destes organismos. Tais publicações deram margem para hipóteses de que a sequência CRISPR poderia estar envolvida com a imunidade bacteriana.

Estudos posteriores indicaram a ocorrência de sequências gênicas adjacentes ao locus CRISPR, as quais foram chamadas de *CRISPR-associated genes* (*Cas*). A molécula de RNA transcrita a partir do locus CRISPR funcionava por cooperação com a endonuclease Cas, produzida a partir de genes localizados próximos à região do locus, derivando daí o termo CRISPR-Cas.

No ano de 2011, o grupo da cientista Emmanuelle Charpentier (Diretora do *Max Planck Institute for Infection Biology*, Berlin, Alemanha) descobriu um componente essencial do sistema CRISPR-Cas: o RNA CRISPR transativador (*tracrRNA*), uma molécula que atua no reconhecimento do DNA invasor, em bactérias. Ao mesmo tempo, a cientista Jennifer Doudna (Universidade da Califórnia, Berkeley, EUA), trabalhava decifrando a estrutura e função biológica de ribozimas, bem como descrevendo um complexo de vigilância baseado em RNA, também em bactérias. Ao se encontrarem em um congresso, Charpentier e Doudna estabeleceram uma parceria que lhes renderia, nove anos depois, o Prêmio Nobel em Química, pelo desenvolvimento da “tesoura genômica”. Essas duas mulheres demonstraram, pela primeira vez, que o sistema CRISPR-Cas era capaz de clivar, não somente o DNA viral invasor, mas qualquer sequência de DNA, de maneira direcionada e específica. Através da Engenharia Genética, elas transformaram o locus CRISPR-Cas em uma ferramenta poderosa de edição genômica, abrindo inúmeras possibilidades, principalmente para o tratamento de doenças genéticas.

CLASSIFICAÇÃO E MECANISMO

Três tipos diferentes do sistema CRISPR-Cas foram inicialmente descritos (Tipo I, Tipo II e Tipo III), os quais são agrupados com base na filogenia, na conservação dos genes CAS e na organização do operon. Os genes CAS codificam as proteínas Cas, um grupo altamente diversificado descrito por interagir, em sua maior parte, com ácidos nucleicos. No geral, nove tipos de proteínas Cas compõem esses sistemas. Envolvidas na adaptação, a Cas1 e a Cas2 estão presentes nos três tipos de sistemas. Em contrapartida, as proteínas Cas5, Cas6 e Cas7, as quais são compostas por diferentes subunidades, estão presentes apenas nos tipos I e III. As outras proteínas Cas são exclusivas para cada tipo de sistema.

O sistema CRISPR-Cas Tipo I tem como assinatura a proteína Cas3 que em conjunto com o complexo *Cascade* (composto por Cse1, Cse2, Cas5e, Cas6e

e Cas7) degrada a molécula de DNA invasora, através do reconhecimento do motivo PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), sequência de três nucleotídeos (5'-NGG-3') presente na molécula invasora. O sistema CRISPR-Cas Tipo II foi descrito no ano de 2012 na bactéria *Streptococcus pyogenes* e tem como assinatura a proteína Cas9, que, em conjunto com o crRNA e o tracrRNA, degrada a molécula do DNA invasor, também por meio do reconhecimento do motivo PAM. Por fim, o sistema CRISPR-Cas Tipo III parece ser o mais complexo e, diferentemente dos outros sistemas, não necessita do motivo PAM para degradar o DNA invasor. Esse sistema tem como assinatura a proteína Cas10, a qual atua em conjunto com complexos similares ao *Cascade*: Csm (Tipo III-A) ou Cmr (Tipo III-B). Enquanto os sistemas Tipo I e Tipo II tem como alvo moléculas de DNA, o sistema do Tipo III pode ter como alvo moléculas de DNA ou de RNA.

Devido à sua simplicidade, o sistema CRISPR-Cas Tipo II, foi adaptado para edição de genomas de organismos mais complexos, originando o sistema de edição genômica conhecido como CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9*). No sistema natural, pequenos fragmentos do DNA invasor são incorporados ao DNA genômico da bactéria, na forma de protoespaçadores entre sequências repetidas (repetições CRISPR), formando os *clusters* que caracterizam as regiões CRISPR. O conjunto de protoespaçadores é transcrito em um único RNA (pré-crRNA), o qual é processado pela enzima RNase III originando os CRISPR RNAs (crRNAs). Essas moléculas associam-se com um segundo tipo de RNA, o *transactivating CRISPR RNA* (tracrRNA), formando um híbrido crRNA:tracrRNA, o qual interage com a endonuclease Cas9. Esse complexo ternário tem como alvo sequências específicas do DNA invasor, as quais são complementares à sequência de 20 nucleotídeos (nt) presentes na extremidade 5' do crRNA, localizadas à jusante (*upstream*) de um motivo PAM. Após o pareamento, a Cas9 cliva as duas fitas do material genético invasor (Figura 2A), através de dois domínios catalíticos presentes em sua estrutura: o domínio HNH, responsável por clivar a fita complementar à sequência do crRNA e o domínio RuvC, responsável por clivar a fita oposta (não complementar).

O sistema adaptado é composto apenas por dois componentes: a endonuclease Cas9 e um RNA guia (gRNA), formado a partir da fusão do crRNA e do tracrRNA. Esse gRNA possui em sua extremidade 5' uma sequência de aproximadamente 20 nt, responsável por guiar a Cas9 até a sequência complementar de

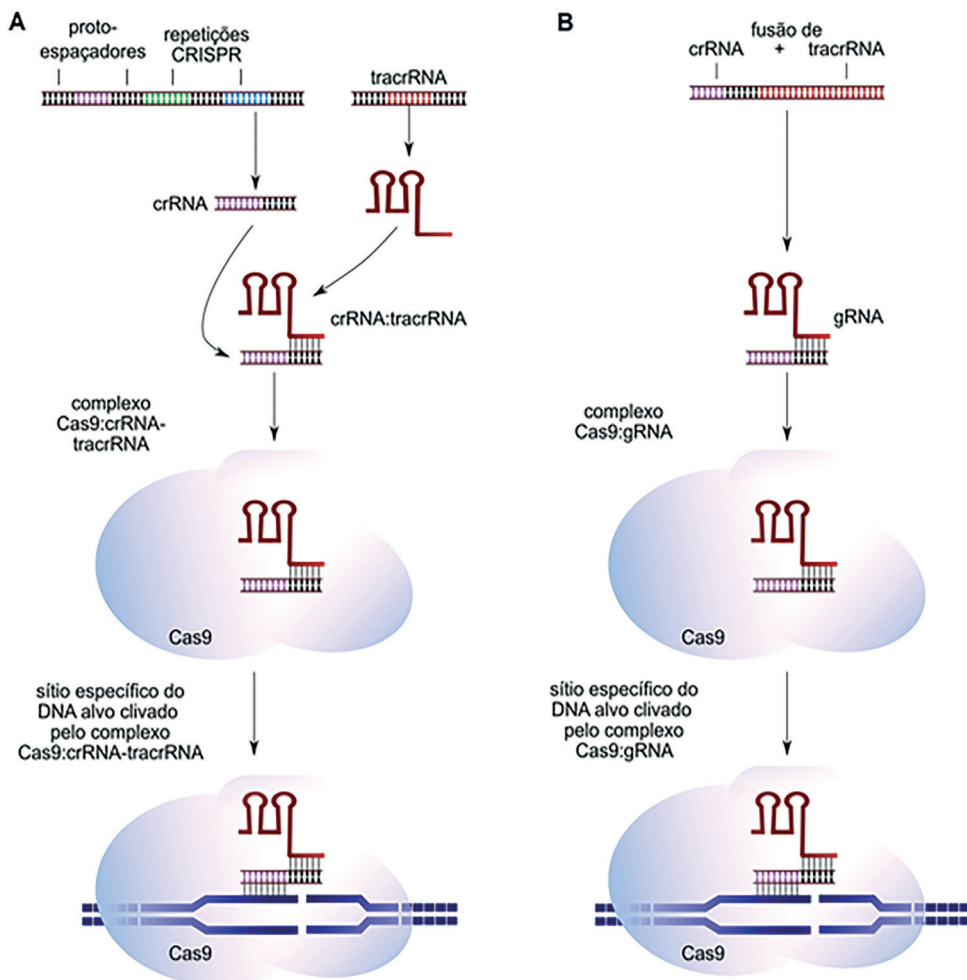
20 nt presente no DNA alvo. A interação do complexo com o DNA alvo só acontece na presença de um motivo PAM adjacente, o qual fica localizado na fita de DNA alvo não complementar (Figura 2B). Isso torna essa ferramenta extremamente interessante, visto que o gRNA é “programável” e pode ser desenhado para se alinhar a qualquer região genômica de interesse.

A clivagem da dupla fita do DNA alvo, realizada pela Cas9, gera extremidades abruptas que necessitam ser reparadas pela célula, visto que este dano pode levar a mesma à apoptose ou à senescência. Dois mecanismos de reparo distintos podem ser ativados para corrigir o dano: I) reparo por recombinação não homóloga através da via de junção de extremidades não homólogas (NHEJ em inglês, *non-homologous end joining*) ou II) reparo por recombinação homóloga através da via de reparo direcionado por homologia (HDR em inglês, *homology directed repair*).

Na maior parte das vezes, a clivagem da dupla fita do DNA alvo gera extremidades que não possuem grau de homologia. Nessas ocasiões, a via de reparo NHEJ é responsável por unir novamente as duas pontas do DNA, através de mecanismos independentes de homologia. No entanto, esse reparo é intrinsicamente propenso a erros, culminando na geração de *indels* no sítio onde ocorreu a clivagem ou próximo a ele. *Indel* é um tipo de mutação que pode ocasionar a inserção ou deleção de um ou poucos nucleotídeos e, consequentemente, alterar a fase de leitura do gene em estudo. Essa mudança quase sempre resulta em códons de parada prematuros, os quais interferem diretamente na estrutura ou função do produto final do gene, levando a formação de moléculas funcionais truncadas. O resultado final é a inativação (nocauteamento) do gene alvo.

No entanto, em algumas ocasiões a clivagem pode gerar extremidades que apresentam homologia entre si ou com alguma molécula de DNA doador exógeno (deve possuir homologia com ambas as extremidades do DNA resultantes da clivagem). A via de reparo HDR é responsável por corrigir o dano nessas situações. Para que essa via seja desencadeada, a endonuclease Cas9 e o gRNA são introduzidos na célula juntamente com uma molécula de DNA doador exógeno. Essa via é extremamente eficiente e culmina no perfeito reparo da região ou em modificações genéticas precisas, como a incorporação de mutações pontuais (substituição alélica) ou a inserção de sequência curtas (*knock-in*).

Figura 2: Sistema natural e modificado de CRISPR/Cas.



(A) O sistema CRISPR/Cas natural incorpora sequências de DNA exógeno dentro dos CRISPR arrays, os quais geram crRNAs que carregam as regiões *protospacer* que são complementares às regiões específicas presentes no DNA invasor. Os crRNAs se ligam, por complementaridade de bases, aos tracrRNAs (que também são codificados pelos sistemas CRISPR) e estes RNAs híbridos podem se associar com a endonuclease Cas9. O complexo crRNA-tracrRNA:Cas9 reconhece e cliva DNAs exógenos, que são posteriormente eliminados por degradação. (B) O sistema CRISPR/Cas adaptado para a pesquisa em organismos mais complexos, requer a fusão entre o crRNA e o tracrRNA em apenas uma molécula denominada RNA guia (gRNA). Uma vez gerado, o gRNA é complexado à Cas9 e direciona a clivagem do DNA-alvo que for complementar à região 5' presente no gRNA à jusante (*upstream*) em relação à sequência de DNA PAM (5'-NGG-3'). A quebra de dupla fita do DNA dispara as vias de reparo da célula através dos mecanismos de recombinação que podem ser não homólogos ou homólogos.

FORMAS ADAPTADAS DA ENZIMA CAS9

A Cas9 tem sido amplamente conhecida por estar associada ao locus CRISPR e pela sua capacidade de clivar fitas de DNA. A proteína Cas9 existente no sistema CRISPR do tipo II, apresenta dois domínios catalíticos responsáveis por sua atividade de endonuclease, a saber: os domínios RuvC e HNH. As formas adaptadas das Cas9 são proteínas que sofreram mutações pontuais (D10A e H840A) nesses domínios catalíticos, de modo a gerar proteínas incapazes de clivar a dupla fita do DNA, porém sem alterações na sua capacidade de ligação ao sítio alvo. Essas proteínas mutantes são chamadas de *dead* Cas9 ou, simplesmente, dCas9. Dessa maneira, é possível acoplar à dCas9 moléculas que atuarão na modulação gênica, inibindo (CRISPRi) ou ativando (CRISPRa) a transcrição do gene de interesse.

Para a utilização do CRISPRi, é necessário que haja o acoplamento da dCas9 com domínios repressores da transcrição, dos quais o domínio KRAB (*Krueppel-associated box*) é o principal representante, por ser o primeiro repressor transcrricional utilizado para alterações epigenômicas precisas. O domínio KRAB age como repressor da transcrição, pois quando levado pela dCas9 até a região regulatória alvo, recruta moléculas que atuam no remodelamento da cromatina, inserindo marcas epigenéticas, como metilação e desacetilação que causarão o bloqueio transitório da transcrição. Outras moléculas repressoras podem ser fusionadas à dCas9, como a LSD1 (*Lysine-specific methylase 1*) e SID (*SIN3-interaction domain*).

Quando o intuito é ativar a transcrição gênica, utilizam-se juntamente com a Cas9, domínios efetores ou ativadores, como VP64, VPR, p65 ou Rta. Nessa abordagem, a região alvo pode ser acetilada ou os genes podem sofrer uma ativação direta pelo recrutamento de fatores de transcrição. Em CRISPRa, ainda é possível maximizar a técnica ao incorporar sistemas capazes de recrutar múltiplos domínios efetores para a região alvo. Exemplos dessas tecnologias são *SunTag*, um arranjo de peptídeos que permite o recrutamento de domínios efetores através de fragmentos variáveis de anticorpos; *Scaffold*, que consiste em uma sequência guia modificada para conter a sequência de um aptâmero, o qual, por sua vez, atrai uma proteína aptâmero-específica fusionada a ativadores transcripcionais; e *SAM*, junção da tecnologia *Scaffold* com a dCas9 fusionada a ativadores transcripcionais.

APLICAÇÕES DO SISTEMA CRISPR/CAS9

Evidentemente, a ferramenta de edição gênica CRISPR/Cas9 está possibilitando grandes progressos em diversas áreas do conhecimento. Sua capacidade de promover eficientemente modificações genéticas possibilita diversos estudos sobre rearranjos genômicos e suas relações com a progressão de doenças, como o câncer; a triagem de drogas terapêuticas e de genes envolvidos em doenças; a criação de organismos-modelo com características específicas para diversos tipos de estudo; além da possibilidade de melhorar organismos economicamente relevantes, como plantas alimentícias e fungos, para diversos fins. Neste tópico, detalharemos algumas dessas possibilidades.

Na Produção de Alimentos:

Melhoramento genético já é um conceito amplamente aceito, sendo aplicado na Agricultura, uma vez que torna possível obter aumento do rendimento (produtividade por planta), melhora na qualidade dos alimentos e resistência das plantas ao estresse biótico ou abiótico, sendo todos estes fatores dependentes da atividade complexa de diversos genes envolvidos em características que impactam no desempenho do produto final. A utilização do sistema CRISPR/Cas9 na Agricultura acelera e torna esse melhoramento ainda mais específico. Uma das vantagens em se utilizar essa tecnologia para gerar edição no genoma de plantas é a possibilidade de se obter um produto livre de transgene. Para evitar problemas regulatórios e ecológicos e buscar a aceitação pública é necessário que não haja vestígios de transgene no produto final, o que pode ser alcançado através da expressão transitória do DNA ou RNA que codifica a maquinaria do sistema.

A primeira modificação de plantas com a aplicação do sistema CRISPR/Cas9 ocorreu em 2013, quando o grupo da pesquisadora Caxia Gao, do Instituto de Genética e Biologia da Academia Chinesa de Ciência, conseguiu modificar quatro genes de um cultivar de arroz e um gene no cultivar de trigo. Estudos agrícolas, utilizando Engenharia Genômica, têm buscado identificar *loci* gênicos responsáveis por características que aumentem a qualidade nutricional, resistência a herbicidas e ao estresse biótico e abiótico. Assim, por exemplo, a edição dos genes GS3, Gn1a, GW2, TGW5 e OsRAV2, através da tecnologia de CRISPR/Cas9, levou ao aumento do número, tamanho e peso de grãos de arroz e conferiu tolerância ao estresse salino; a edição do gene ALS1 e GBSS, tornou batatas mais resistentes a herbicidas e conferiu maior teor de amilopectina; a edição do gene CsLOB1, fez com que laranjeiras se tornassem resistentes a bactérias causadoras de úlceras.

Infecção de grandes lavouras por vírus pode ser catastrófica, além de gerar significativo impacto econômico. Pensando nisso, pesquisadores utilizam o sistema CRISPR/Cas9 para desenvolver imunidade nas plantas contra vários germinivírus, como o Vírus da Folha Amarela do Tomate (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus* – TYLCV), Vírus da Beterraba Encaracolada (*Beet Curly Top Virus* – BCTV) e o Vírus do Mosaico do Nabo (*Turnip Mosaic Virus* – TuMV).

Além de seu uso no melhoramento vegetal, a edição gênica por CRISPR/Cas9 pode ser utilizada como estratégia de defesa na produção de bioprodutos de interesse comercial, como enzimas e laticínios. As plantas industriais que utilizam bactérias para gerar o produto de interesse são propensas ao ataque por bacteriófagos, sendo assim, a utilização do sistema CRISPR/Cas9 para gerar cepas bacterianas resistentes a estes fagos é uma aplicação bastante promissora desta tecnologia.

Levando em consideração as mudanças climáticas pelas quais o Mundo está passando, problemas de desertificação e salinização de áreas, aumento da população mundial, com expectativa de chegar aos 8,3 milhões em 2030, é premente a necessidade de utilizar novas tecnologias para garantir segurança alimentar para as próximas gerações, sendo a edição gênica, via CRISPR/Cas9, sem dúvida alguma, uma grande aliada da Humanidade neste aspecto.

No Combate a Agentes Causadores de Doenças:

Um nicho promissor para a utilização da tecnologia de edição gênica é a manipulação genética de mosquitos transmissores de doenças.

Pesquisas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) buscam identificar e modificar genes envolvidos na resistência do mosquito *Aedes aegypti* à infecção pelo vírus da dengue. Realizando edições gênicas em embriões do mosquito, é possível estabelecer uma população de *Aedes aegypti* resistente ao vírus que, consequentemente, será impossibilitada de infectar seres humanos. CRISPR/Cas9 está sendo utilizado, ainda, em progenitores neurais humanos para identificar genes que, quando mutados, conferem resistência à morte celular induzida pelo Zika vírus.

O papiloma vírus humano (HPV) possui duas proteínas (E6 e E7), que são responsáveis por conferir o caráter maligno (canceroso) ao tecido infectado. Pesquisadores induziram mutação nos oncogenes que codificam essas proteínas, tornando-as inativas e promovendo efeitos antitumorais de genes supressores tumorais, como os p53 e pRb. Da mesma maneira, estudos utilizando CRISPR/Cas9, têm inibido a replicação do vírus da hepatite B em linhagem celular humana.

Na Terapia Gênica:

Uma aplicação do sistema CRISPR/Cas9, na qual é impossível não pensar, é a edição do genoma de organismos eucariotos, visando terapias que possam trazer melhoras significativas ou até mesmo a cura de determinadas doenças. A comunidade científica tem se debruçado sobre tal possibilidade. Trabalhos de Gao e colaboradores descreveram, em 2017, a edição do genoma de ratos que possuem um alelo dominante do gene *Tmcl* (*Transmembrane Channel-like Gene Family 1*), chamados de linhagem *Beethoven* (*Bth*), uma vez que este gene está associado à surdez. Os resultados foram animadores, pois houve uma melhora na taxa de sobrevivência das células ciliadas auditivas (células transdutoras das vibrações acústicas em sinais elétricos nervosos e que são afetadas por mutações no gene *Tmcl*). Além disso, houve uma melhora no reflexo comportamental acústico em animais que foram tratados para a eliminação funcional do alvo, apontando que tal método é passível de ser utilizado no tratamento da perda de audição autossômica dominante.

Outro exemplo que pode ser citado é a edição, via CRISPR/Cas9, do oncogene *HER2* (*Human Epidermal growth fator Receptor 2*). Esse oncogene, que nomeia um dos subtipos de câncer de mama, quando superexpresso pelas células tem a capacidade de gerar neoplasia mamária. Ao realizarem a edição, os autores verificaram diminuição do crescimento da linhagem celular que apresentava amplificação desse oncogene.

Estudos explorando letalidade sintética, demonstraram que edições concomitantes, por CRISPR/Cas9, dos genes *SETDB1* (*SET Domain Bifurcated 1*), envolvido na regulação epigenética de expressão, e do gene *CHD4* (*Chromodomain Helicase DNA-Binding Protein 4*), envolvido no reparo de danos ao DNA, podem tornar células tumorais mais sensíveis à ação de quimioterápicos genotóxicos. Um outro exemplo prático do uso do CRISPR para terapia gênica em células somáticas é a manipulação de células do sistema imunológico de pacientes com câncer, com o objetivo de que as células de defesa reconheçam as células cancerígenas que costumam passar despercebidas pelo sistema de defesa. Essa aplicação tem se mostrado segura e com resultados cada vez mais promissores. Além desses exemplos, diversos tipos de doenças já podem ser tratadas com terapia gênica utilizando-se CRISPR.

Alguns cientistas estão desbravando um território repleto de questões éticas e regulamentares que é o estudo da edição para corrigir genes defeituosos em embriões humanos. Ma e colaboradores realizaram a edição do gene *MYBPC3* (*Myosin Binding Protein C3*) em embriões humanos. Existe uma condição cardiopatológica

conhecida como cardiomiopatia hipertrófica que pode ser causada pela mutação em vários genes, incluindo o gene MYBPC3, que codifica uma proteína de mesmo nome, sendo importante para manter a estrutura do músculo cardíaco, bem como para regular a contração e relaxamento do mesmo. Ao realizar a edição desse gene, buscando corrigi-lo, os autores verificaram que, quando os componentes da edição foram injetados em uma fase e de uma maneira específica no oócito, 72,4% dos embriões apresentaram apenas a cópia saudável do gene MYBPC3. É importante ressaltar que, nesse caso, os embriões não foram implantados.

No entanto, é inegável a necessidade de discussões e regulamentações claras a respeito das implicações éticas na utilização da ferramenta CRISPR/Cas9. E isso é assunto para nosso próximo tópico.

Implicações éticas da tecnologia de CRISPR/Cas9

O potencial para se realizar Engenharia Genética, Biotecnologia e pesquisas básicas cresceu exponencialmente com o rápido avanço das técnicas de edição de genomas. Por isso, ao utilizar essas ferramentas inovadoras devemos nos questionar sempre sobre as implicações éticas e as consequências dos produtos gerados e das manipulações genéticas que estão sendo propostas, além de outras questões que dependerão dos objetivos que movem cada estudo ou o desenvolvimento de uma nova tecnologia.

O sistema CRISPR é uma tecnologia de edição genômica extremamente simples e barata, uma vez que depende apenas da expressão da enzima Cas9 e do gRNA nas células ou organismo alvo. Desde que o CRISPR passou a ser amplamente utilizado, há cerca de oito anos, tendo resultado, inclusive, na premiação de duas pesquisadoras como o Nobel de Medicina, como citado na Introdução deste trabalho, tanto as revistas científicas como os órgãos internacionais debatem questões éticas que determinam limites para a aplicação desta tecnologia.

Dentre a ampla gama de possibilidades para a manipulação de genomas, questões éticas relacionadas à manipulação genética de embriões humanos é a mais delicada. A descoberta do sistema CRISPR fez ressurgir a onda de debates dada a precisão e facilidade com que esta técnica pode ser empregada. Segundo o Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano nos Estados Unidos (NHI), em 2014, 40 países desencorajaram ou baniram completamente pesquisas que envolvem edição genética de células germinativas humanas. A fim de regular tais tipos de pesquisa, criou-se em 2015 o *International Summit on Human Gene Editing*. No Brasil, a Lei de Biossegurança 11.105, de 2005, no artigo sexto, proíbe Engenharia Genética em células germinativas, zigotos ou

embriões humanos. Em geral, especialistas da área concordam que a edição do genoma humano para fins reprodutivos não deve ser utilizada, uma vez que os riscos não são justificados pelo potencial benefício que a técnica pode trazer.

No entanto, há um grande interesse no uso da tecnologia de CRISPR/Cas9 para fins terapêuticos que não envolvem a manipulação gênica de células germinativas. Mas, ainda assim, em 2018, um acontecimento estremeceu a comunidade científica, quando o cientista chinês He Jiankui, admitiu ter criado os primeiros bebês geneticamente modificados da história. Segundo o pesquisador, ele editou o gene CCR5 (*C-C Chemokine Receptor 5*), que codifica receptores utilizados pelo HIV para infectar as células e isso tornaria as gêmeas, Lulu e Nana (nomes fictícios), resistentes à infecção pelo vírus. Estudos que também realizaram a mutação do gene Ccr5, porém em ratos, demonstraram que os animais modificados se tornaram cognitivamente mais habilidosos, principalmente em se adaptar e em memorizar. Os resultados em ratos foram benéficos, mas não se pode garantir que em Lulu e Nana, e em sua descendência, eles também serão. Vale lembrar, ainda, que o cientista responsável por essa façanha foi condenado a três anos de prisão.

Assim sendo, surge cada vez mais a necessidade do aprofundamento da técnica, no que diz respeito à segurança, reprodutibilidade, efeitos a longo prazo e, principalmente, discussões sobre o estabelecimento de limites em sua utilização.

Após esta breve Introdução, a seguir será descrita, de forma detalhada, o passo a passo de como realizar uma edição gênica confiável utilizando o sistema CRISPR/Cas9.

INÍCIO DA EDIÇÃO GÊNICA ESCOLHA DO ALVO, DA ESTRATÉGIA DE EDIÇÃO GÊNICA E DESENHO DOS RNAS GUIAS (GRNAS)

O passo inicial no processo de edição gênica utilizando o sistema CRISPR/Cas9 é a escolha do gene/região alvo. Em nosso grupo de pesquisa, realizamos experimentos de perda e ganho de função em linhagens celulares normais e tumorais, visando descobrir alvos moleculares que possam auxiliar no prognóstico, diagnóstico ou no tratamento da doença. Um gene superexpresso em linhagens tumorigênicas, por exemplo, torna-se um interessante alvo a ser estudado neste contexto, justificando e dando base para o desenvolvimento de um projeto de pesquisa (este é apenas um exemplo, visto que a escolha do seu gene/região alvo pode ter outra justificativa em um outro modelo de estudo).

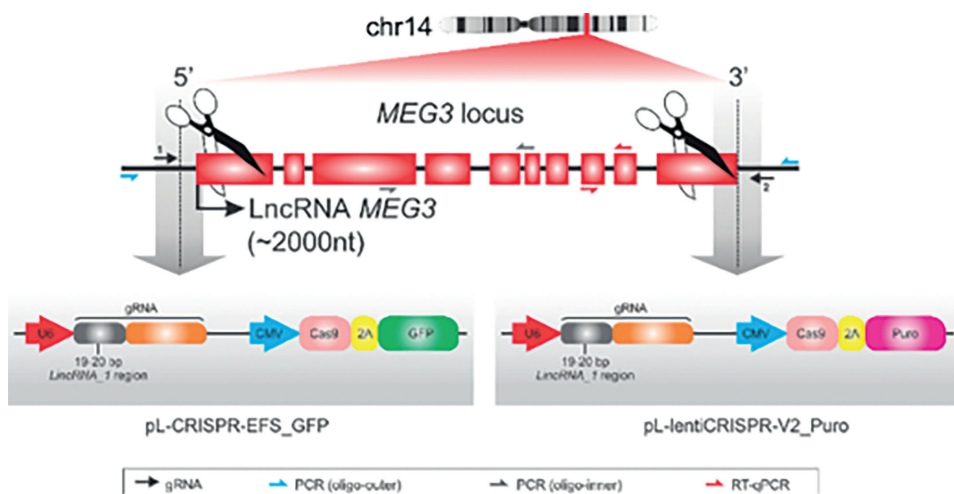
Após a escolha do gene/região alvo, é de extrema importância conhecer as características moleculares e estruturais do mesmo e de seus produtos, sejam eles RNAs funcionais ou proteínas. Isso é importante para direcionar a escolha da estratégia de edição gênica. No contexto da técnica de CRISPR, a expressão

“edição gênica” se refere à capacidade de alterar a sequência nucleotídica do gene-alvo (nucleotídeos ou genes inteiros podem ser alterados) afetando, assim, sua expressão/função. Quando essas alterações são muito extensas (envolvendo regiões cromossômicas) ou muito numerosas (englobando múltiplos genes simultaneamente), referimo-nos à “edição genômica”. Adotando uma classificação simples, as diversas formas de edição gênica podem ser classificadas em quatro grupos: I) inserção de transgenes, II) substituição alélica, III) nocauteamento por inativação gênica, IV) nocauteamento por deleção gênica.

A inserção de transgenes (*knock-in* – KI) e a substituição alélica são realizadas utilizando-se um DNA doador exógeno, o qual apresenta extremidades com homologia em relação a alguma região do genoma. Esse processo é baseado no reparo por recombinação homóloga (HDR) e permite a integração de transgenes em regiões específicas do genoma (intergênicas) ou a troca de uma sequência endógena de nucleotídeos por uma sequência exógena ligeiramente diferente, portando SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) ou pequenas mutações.

O nocauteamento por inativação gênica é realizado através de mutações que levam à perda da atividade do produto final deste gene, gerando alelos nulos, ou seja, sem função biológica. É interessante citar que em alguns casos, alelos não nulos podem ser gerados, permitindo uma atividade ainda que parcial do gene-alvo. Utilizando o sistema CRISPR, uma clivagem sítio-dirigida no DNA-alvo é ocasionada, a qual pode ser prontamente corrigida por mecanismos de reparo da célula. Um desses mecanismos, a união de extremidade não homóloga (NHEJ) é um mecanismo propenso a erros, podendo ocasionar a adição/deleção de nucleotídeos, alterando a fase de leitura do gene em estudo. Essa mudança quase sempre resulta em códons de parada prematuros, gerando, assim, moléculas funcionais truncadas.

Em alguns casos, o nocauteamento por deleção gênica, no qual o gene inteiro é removido, pode ser mais interessante do que gerar mutações pontuais, visto que resultará em uma mutação nula, onde ambos alelos do gene podem ser completamente deletados. Nesse caso, utilizam-se duas endonucleases Cas9 e dois gRNAs com sequências distintas (Figura 3).

Figura 3: Estratégia utilizada para deleção do gene não codificador de proteína MEG3.

Dois RNAs guias foram utilizados simultaneamente para direcionar a enzima Cas9 para a região 5' e 3' do gene MEG3, promovendo a deleção do locus gênico (Deocesano-Pereira et al., 2019).

Após a escolha do gene/região alvo e da estratégia de edição gênica que será utilizada, o próximo passo é o desenho dos RNAs guias (gRNAs), moléculas de RNA exógeno que são projetadas para se alinhar à região de interesse, baseando-se nos princípios do pareamento de bases propostos por Watson e Crick, e clivá-las com auxílio da endonuclease Cas9. Esses RNAs possuem 20 nucleotídeos, que são complementares à molécula de DNA-alvo, sendo localizados ao lado da sequência PAM. O desenho dessas moléculas pode ser realizado através de diversos *softwares* disponíveis na literatura. Geralmente, cerca de 250 a 500 nucleotídeos do DNA genômico-alvo são submetidos a essas plataformas, que fornecem uma lista de gRNAs ordenados por um *score*. Esse *score* leva em consideração o número de sítios *off-targets*, além da proximidade com as sequências PAM (NGG). *Off-targets* são regiões no genoma que podem ser afetadas indiretamente por um determinado gRNAs. O ideal na escolha do seu gRNA é escolher aquele que apresenta o menor número de sítios *off-targets*, visto que a probabilidade de uma outra região do genoma-alvo ser afetada será menor. De qualquer forma, após a realização do CRISPR, deve-se validar, por sequenciamento genômico, as eventuais (e prováveis) regiões *off-targets* relacionadas ao gRNA escolhido. O esperado é que essas regiões permaneçam inalteradas geneticamente. É também indicado que se teste mais de um gRNA para cada região alvo, uma vez que a eficiência de edição pode variar consideravelmente entre as sequências selecionadas. Após a escolha dos gRNAs, nucleotídeos extras devem ser adicionados em suas extremidades (gerando extremidades coesivas), as quais

serão importantes no processo de ligação dos gRNAs aos vetores linearizados do sistema CRISPR/Cas9.

PROTOCOLO 1

1. Obtenção da sequência genômica alvo

Duas plataformas podem ser indicadas para a obtenção das sequências do DNA genômico alvo:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <https://genome.ucsc.edu/>

2. Escolha do *software* para desenho dos RNAs guias (gRNAs)

Diversos *softwares* estão disponíveis na literatura. A seguir, algumas sugestões:

- <https://zlab.bio/guide-design-resources>
- <http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html>
- <http://guides.sanjanalab.org/#/>
- <http://chopchop.cbu.uib.no/>

3. Submissão da sequência genômica-alvo ao *software*

4. Escolha dos RNAs guias (gRNAs)

- Baseados nos maiores *scores*.
- Levar em consideração o número de sítios *off-targets*.

5. Síntese dos RNAs guias (gRNAs)

- Dois *primers* devem ser sintetizados (*Forward e Reverse*), os quais serão anelados e ligados ao vetor específico do sistema CRISPR/Cas9.

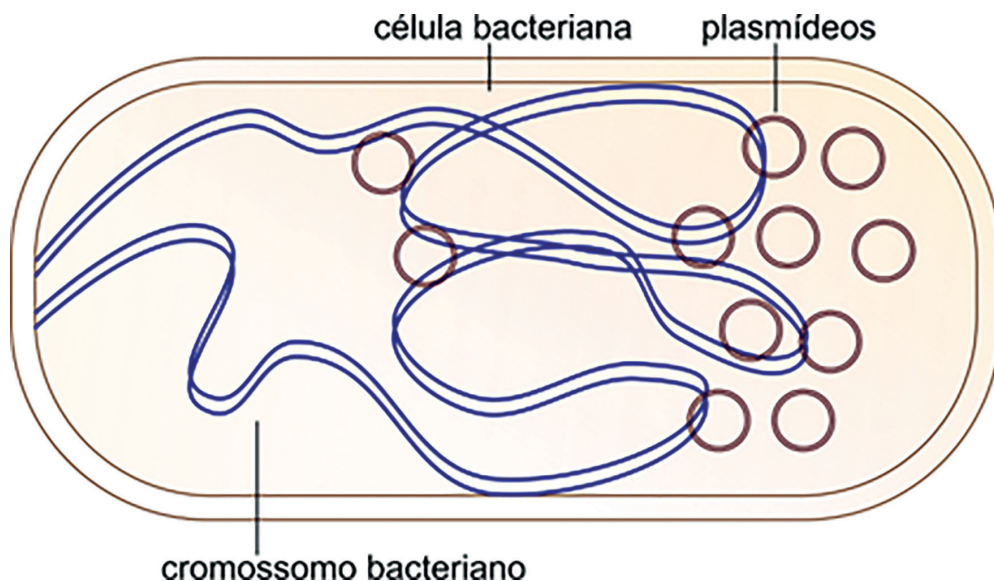
É importante realizar a adição de nucleotídeos extras em suas extremidades (gerando extremidades coesivas), as quais serão importantes no processo de ligação dos gRNAs aos vetores linearizados do sistema CRISPR/Cas9.

PRODUÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

DIGESTÃO E DESFOSFORILAÇÃO DO PLASMÍDEO, ANELAMENTO E FOSFORILAÇÃO DOS RNAs GUIAS E REAÇÃO DE LIGAÇÃO AO VETOR

Para utilização do sistema CRISPR/Cas9, diversas técnicas de Biologia Molecular são empregadas, sendo que as primeiras a serem colocadas em prática, serão as ferramentas que permitem a construção de uma molécula de DNA recombinante. A princípio, é preciso ter em mãos os plasmídeos e os *primers* correspondentes à sequência gênica (gRNAs) na qual se deseja realizar a edição. Plasmídeos são moléculas de DNA dupla fita e circulares, que estão naturalmente presentes em bactérias, replicam independentemente do cromossomo bacteriano e, na maioria das vezes, conferem resistência a algum antibiótico ou produzem outras moléculas importantes para a sobrevivência do micro-organismo (Figura 4).

Figura 4. Célula bacteriana com seu DNA cromossomal e seus plasmídeos.

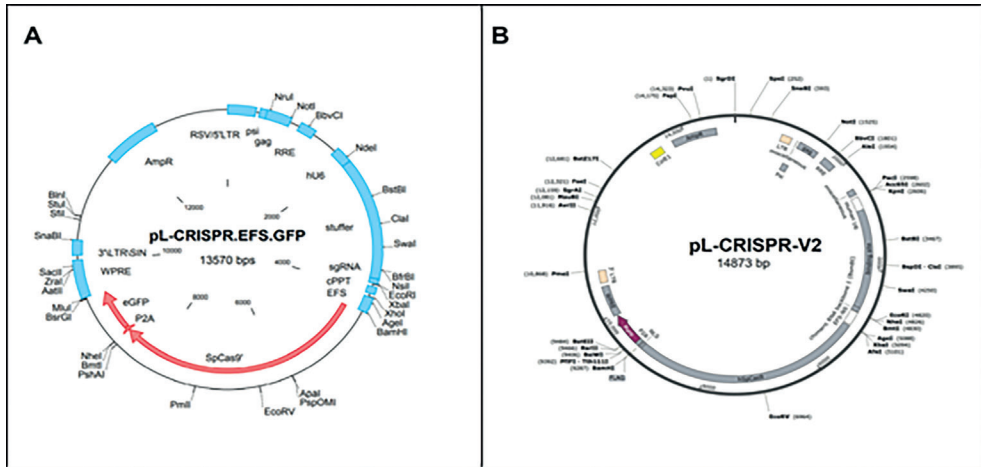


Muitos desses plasmídeos naturalmente presentes em bactérias foram modificados para sua utilização em Biologia Molecular. Adotaremos como exemplo, na descrição dos próximos passos, a estratégia de nocauteamento por inativação gênica (onde um único plasmídeo e um único RNA guia são utilizados) e por deleção gênica (na qual dois plasmídeos e dois RNAs guias são utilizados), metodologias consolidadas em nosso grupo de pesquisa.

O(s) plasmídeo(s) utilizado(s) devem apresentar uma marca de seleção, a qual é importante para selecionar, futuramente, as células que sofreram a edição gênica. Citaremos como exemplo dois tipos de plasmídeos que podem ser utilizados. O primeiro, plasmídeo pL-CRISPR.EFS.GFP (*Addgene*), apresenta, como marca de seleção, uma sequência gênica responsável pela produção da proteína fluorescente verde (GFP) (Figura 5A). Já o segundo plasmídeo, pL-Lenti.CRISPR-V2 (*Addgene*), apresenta, como marca de seleção, um cassete de resistência ao antibiótico puromicina (Figura 5B). Esses dois plasmídeos apresentam outras regiões importantes para seu funcionamento, a saber: a) um sítio codificador da β -lactamase (enzima que catalisa a degradação do antibiótico ampicilina), conferindo resistência a este antibiótico (necessário para a etapa de seleção do vetor recombinante); b) a sequência que codifica a endonuclease Cas9, e outros elementos necessários para a

produção viral (quando se trata de uma estratégia que utilize lentivírus); e c) uma região para a inserção da sequência dos RNAs guias.

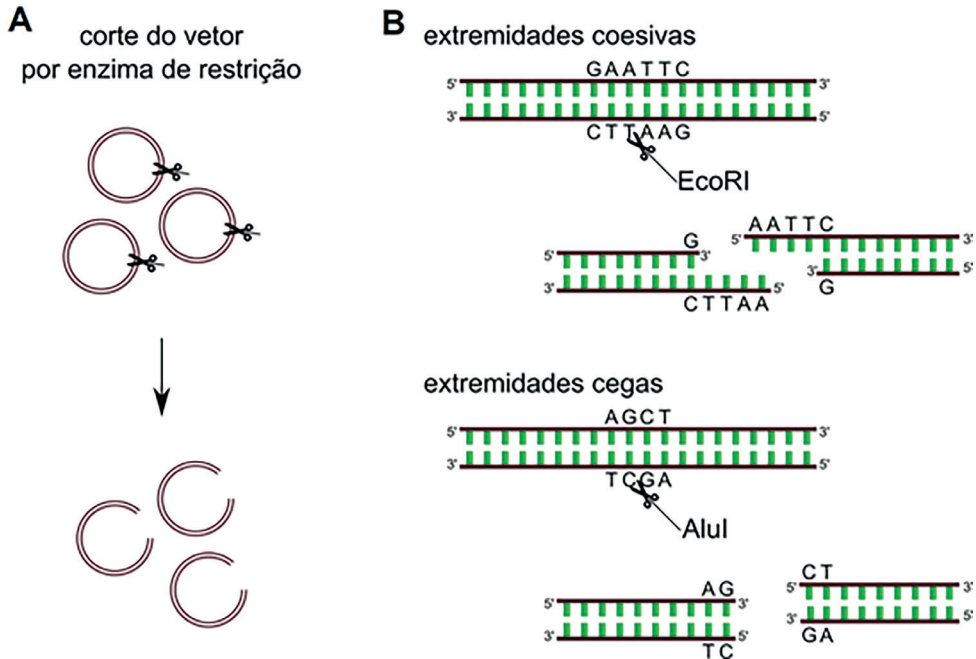
Figura 5. Exemplos de vetores que podem ser utilizados no sistema de edição gênica CRISPR/Cas9.



Conforme descrito anteriormente, os RNAs guias são sequências de aproximadamente 20 nucleotídeos que servem para ‘guiar’ a endonuclease Cas9 até o sítio de clivagem específico no genoma da célula alvo. Para que seja possível a inserção da sequência desejada no vetor de expressão, o primeiro passo a ser realizado é a abertura do vetor, através da quebra de ligações fosfodiéster, de modo que este adquira a conformação linearizada (Figura 6A).

Para tanto, utilizam-se enzimas de restrição que clivam o vetor em sequências específicas, gerando extremidades que podem ser cegas (*blunt ends*) ou coesivas (*sticky ends*), como visto na Figura 6B. No nosso caso, utilizaremos a enzima de restrição *BsmBI*, isolada do *Bacillus stearothermophilus*, a qual cliva os vetores, originando extremidades coesivas.

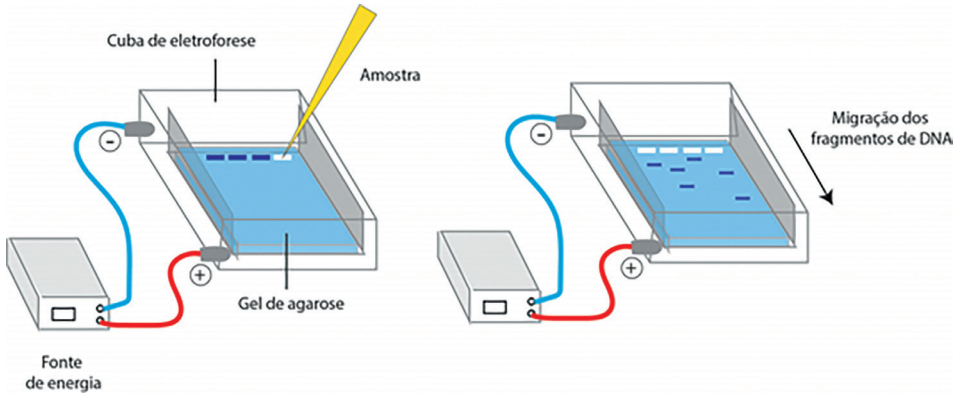
Figura 6. Digestão do plasmídeo.



A) Abertura do plasmídeo com enzimas de restrição. B) Extremidades cegas e coesivas geradas pela clivagem através de enzimas de restrição.

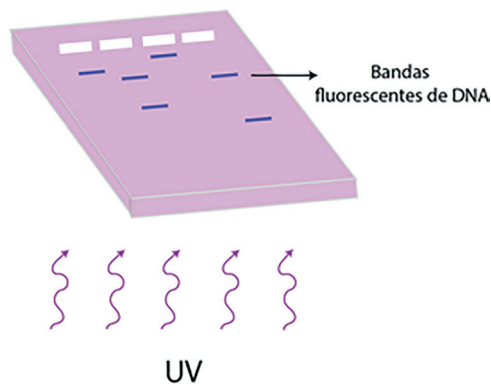
Antes de avançar para as etapas seguintes de preparação do vetor, é importante confirmar se este foi, de fato, digerido. Para tanto, deve-se realizar uma eletroforese em gel de agarose para observar o padrão de migração do vetor, o qual, se digerido, deverá migrar com maior facilidade do que o vetor não digerido. A eletroforese é uma técnica de separação que leva em consideração a taxa de migração de moléculas carregadas quando um campo elétrico é aplicado. Devido à presença do grupamento fosfato, o DNA possui carga negativa, portanto, ao ser aplicado um campo elétrico, a molécula de DNA migrará para o polo positivo. Usualmente, utiliza-se agarose que, quando solidificada, forma uma rede porosa pela qual a molécula migrará. Quanto maior a concentração de agarose, menor será o diâmetro dos poros formados. Dessa forma, fragmentos maiores ou lineares de DNA, encontrarão maior dificuldade em migrar, enquanto os fragmentos menores ou circulares, encontrarão menor dificuldade em migrar pela malha porosa (Figura 7).

Figura 7. Migração do DNA em gel de agarose.



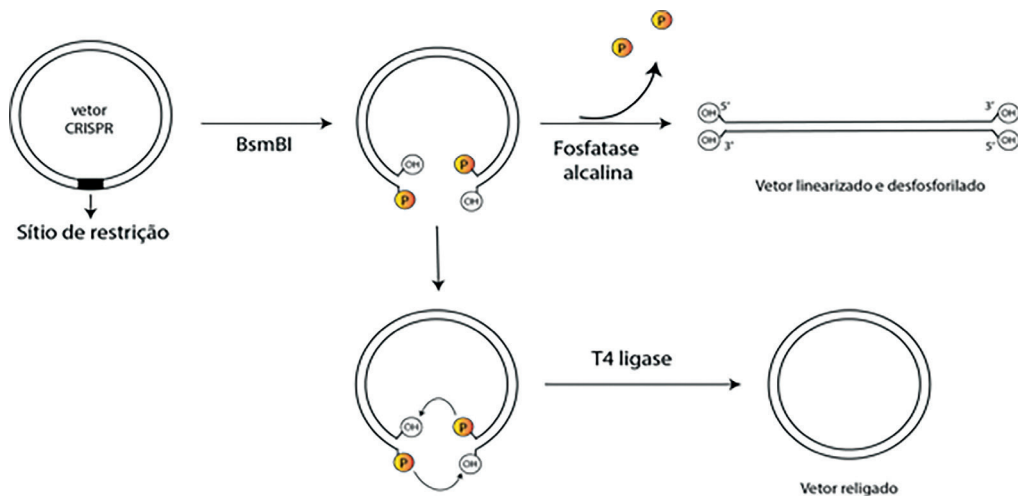
Para possibilitar a visualização do DNA, é adicionado brometo de etídio (EtBr) ao gel de agarose. O EtBr se intercala na dupla fita do DNA e fluoresce quando atingido por radiação UV (Figura 8). Assim, é possível visualizar e realizar outros procedimentos, como o corte da banda gerada para posterior extração do DNA presente no gel.

Figura 8. Visualização das bandas de DNA em gel de agarose contendo brometo de etídio após incidência de radiação UV.



Na etapa seguinte, é realizada a desfosforilação do vetor. Isso se faz necessário pois a abertura do vetor irá gerar extremidades com grupamentos fosfato e hidroxila livres. Caso o grupamento fosfato das extremidades 5' não seja retirado, o vetor irá assumir novamente a conformação circular, antes da inserção do RNA guia (Figura 9). Essa modificação na extremidade do vetor é feita utilizando-se a enzima fosfatase alcalina.

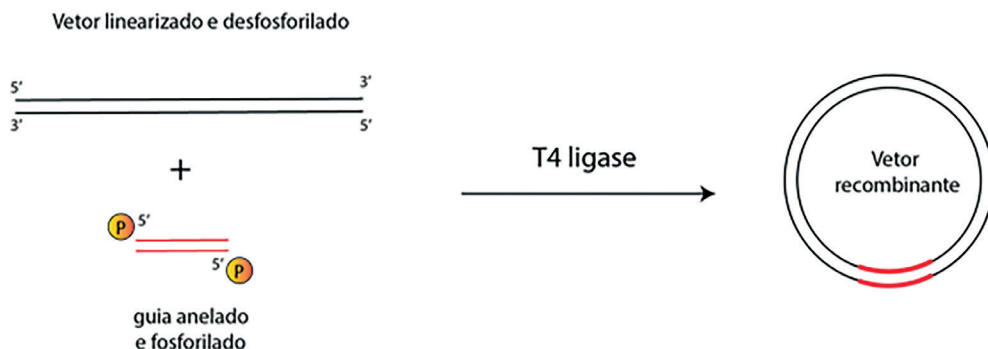
Figura 9. Desfosforilação do vetor.



O próximo passo é a fosforilação e anelamento dos RNAs guias (forward + reverse), de modo que assumam a configuração de dupla fita. A fosforilação é essencial, pois permite que os grupamentos fosfato adicionados nas extremidades dos guias se liguem aos grupamentos hidroxilas livres do vetor. A fosforilação é catalisada por quinases específicas.

Por fim, a última etapa da construção do plasmídeo recombinante é a reação de ligação que, como o próprio nome já diz, realiza a união entre o vetor e o RNA guia, restabelecendo a ligação fosfodiéster (Figura 10). Para esse fim, utiliza-se uma DNA ligase usualmente purificada a partir de *E. coli* infectada com o fago T4.

Figura 10. Reação de ligação do gRNA ao vetor.



PROTOCOLO 2

1. Digestão dos plasmídeos lentivirais utilizados na edição gênica

Exemplos: pL-CRISPR.EFS.GFP e pL-CRISPR-V2

Reação para volume final de 50 uL:

- X uL dos plasmídeos (10 ug de DNA plasmideal);
- 1,5 uL de enzima BsmBI (Esp3I) 10 U/uL;
- 5 uL do Buffer Tango 10X;
- X uL de água deionizada;
- Incubar no termociclador, a 37 °C, overnight. No dia seguinte, inativar a enzima a 65 °C por 20 min.

2. Desfosforilação dos plasmídeos digeridos com a enzima *BsmBI*

Reação para volume final de 80 uL:

- X uL do plasmídeo digerido (~10 ug do plasmídeo);
- 6 uL de Alkaline Phosphatase Buffer 10x FastAP (Fermentas);
- 10 uL da enzima Alkaline Phosphatase FastAP (Fermentas #EF0691);
- X uL de água deionizada;
- Incubar a 37 °C por 30 min e inativar a enzima por 5 min a 75 °C;
- Quantificar os plasmídeos com auxílio de um espectrofotômetro através da Absorbância a 260 nm e sua pureza através da razão A260 nm/A280 nm, valor que deve ser próximo de 2,0;
- Correr um gel de agarose 1% para verificar digestão total do plasmídeo (cerca de 4 uL dos plasmídeos fechados e digeridos);
- Não é necessário realizar a purificação da reação, pois o volume utilizado será muito pequeno em relação às reações de ligação.

3. Anelamento dos RNAs guias

Reação para volume final de 10 uL:

- 1 uL do RNA guia *forward* (100 uM);
- 1 uL do RNA guia *reverse* (100 uM);
- 1 uL de T4 Ligation Buffer 10X (Fermentas);
- 1 uL de T4 Polynucleotide Kinase 10 U/uL (Fermentas, #EK0032);
- 6 uL de água deionizada;
- Incubar a 37 °C por 30 min; 95 °C por 5 min; *ramp down* para 25 °C com a taxa de 5 °C por min;
- Diluir o *duplex* dos RNAs guias 1:100 (1 uL dos RNAs guias anelados + 99 uL de água deionizada).

4. Reação de ligação do RNA guia ao vetor

Reação para volume final de 20 uL:

- X uL de cada plasmídeo digerido e desfosforilado (~230 ng do DNA plasmideal);
- 2 uL do *duplex* 1:100 dos *primers* diluídos;
- 2 uL de T4 DNA Ligase Buffer 10X (NEB);
- 1 uL da T4 DNA Ligase (NEB, #M0202S);
- X uL de água deionizada;
- Incubar a 16 °C, overnight. No dia seguinte, inativar a enzima a 65 °C por 10 min.

5. Precipitação do plasmídeo recombinante

Reação para precipitar 10 uL da reação de ligação:

- 2 uL de glicogênio em 10 uL de ligação;

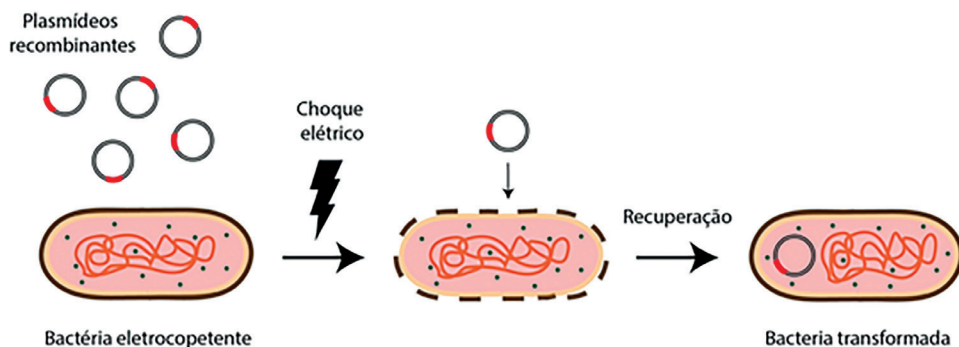
- 20 uL de isopropanol;
- Deixar 30 min no gelo;
- Centrifugar por 10 min, 11.000 RPM, a 4 °C;
- Retirar o sobrenadante;
- 20 uL de etanol 70%;
- Centrifugar por 5 min, a 11.000 RPM, a 4 °C;
- Ressuspender em 15 uL de água deionizada.

MINIPREPARAÇÃO DE DNA DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

ELETROPORAÇÃO DE BACTÉRIAS, MINIPREPARAÇÃO BACTERIANA E DIGESTÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

Uma das técnicas utilizadas para inserir o DNA plasmideal recombinante em bactérias é a eletroporação. Nesse processo, as bactérias são submetidas a um pulso elétrico, de modo que sejam formados poros na membrana bacteriana, possibilitando, assim, a entrada dos plasmídeos (Figura 11).

Figura 11. Inserção de DNA recombinante em bactéria por eletroporação.

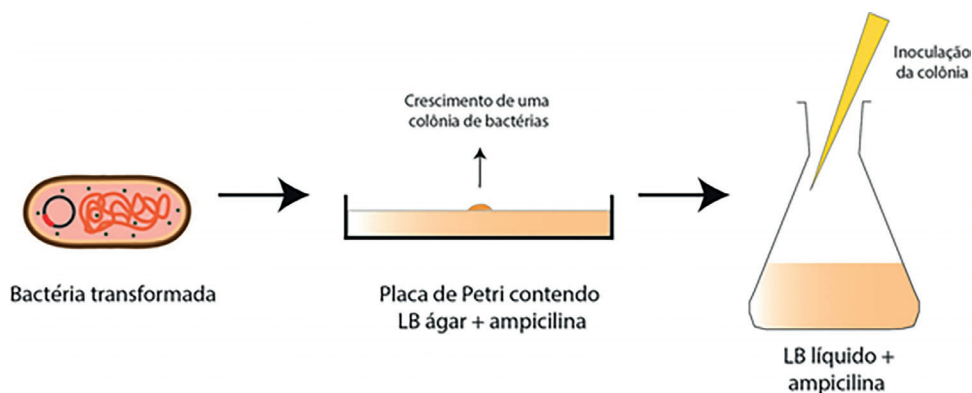


Devido ao fato de ser utilizado pulso elétrico, os sais presentes nos tampões das etapas anteriores (digestão, desfosforilação, fosforilação e ligação) acarretam maior condutividade elétrica, gerando um pulso maior do que o necessário para a abertura dos poros bacterianos. Por isso, é necessário realizar a precipitação do plasmídeo (descrito no protocolo anterior), antes da eletroporação, para que o excesso de sais seja eliminado.

O racional de inserir a molécula de DNA recombinante nas bactérias reside no fato de que esses micro-organismos se multiplicam de maneira muito mais rápida do que células de mamíferos, por exemplo. As bactérias têm a tendência de se duplicarem a cada 20 a 30 minutos e, uma vez dentro delas, a molécula recombinante também é duplicada diversas vezes, o que faz das bactérias ótimas ‘máquinas’ para a produção de DNA recombinante.

Após o pulso elétrico, as bactérias são inoculadas em LB ágar contendo ampicilina, antibiótico ao qual o vetor confere resistência e, por isso, apenas as células bacterianas que receberam o vetor, conseguirão sobreviver e se multiplicar. Aproximadamente 16 h após o plaqueamento, colônias bacterianas terão sido formadas; estas serão agora adicionadas ao LB líquido contendo o antibiótico e incubadas por mais 16 h, a 37 °C e sob agitação, de modo que seja obtida maior quantidade de bactéria e, consequentemente, maior quantidade de DNA recombinante (Figura 12).

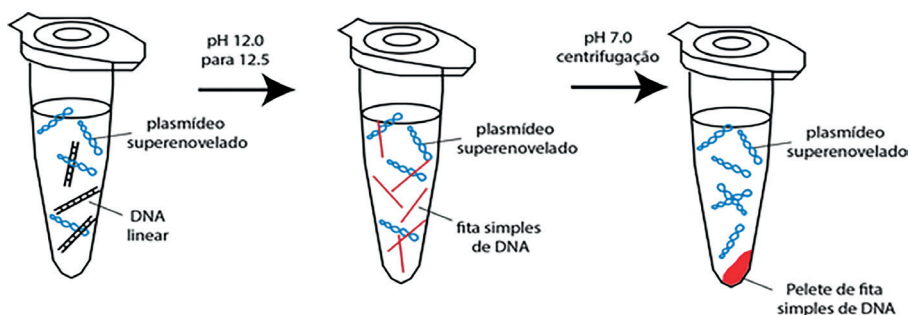
Figura 12. Crescimento bacteriano para a produção de DNA recombinante.



Após o período de incubação em condições ótimas para proliferação bacteriana, é necessário extrair o DNA plasmideal recombinante para uso posterior. Nesse momento, lança-se mão da minipreparação bacteriana ou, simplesmente, “miniprep”. A miniprep é um método utilizado para a

recuperação dos plasmídeos recombinantes inseridos nas bactérias. Os métodos de extração de DNA consistem, basicamente, em duas etapas. A primeira é a liberação da molécula de DNA plasmideal através da lise celular e o segundo é o tratamento químico e/ou enzimático da amostra para retirada de contaminantes. Na lise, são utilizados detergentes, como o SDS (dodecil sulfato de sódio), frequentemente associado com algum álcali, como NaOH. O SDS tem a função de se intercalar entre os fosfolipídios da membrana, gerando poros, enquanto o hidróxido de sódio degrada a parede celular e desfaz as ligações (pontes) de hidrogênio presentes entre as duas fitas do DNA plasmideal mais relaxado, bem como do DNA cromossômico. A retirada dos contaminantes se inicia com a neutralização do pH, pois quando se adiciona ácido acético, as cadeias de DNA voltam a se unir. No entanto, pedaços grandes de DNA cromossômico rompido e de plasmídeo relaxado, não conseguem se hibridizar perfeitamente, gerando uma massa emaranhada que pode ser separada por centrifugação, de modo que se obtenha, no sobrenadante, principalmente, DNA plasmideal (Figura 13). Em seguida, a preparação é colocada em uma coluna de sílica positivamente carregada, para que, devido ao caráter negativo da molécula de DNA, este fique retido na coluna.

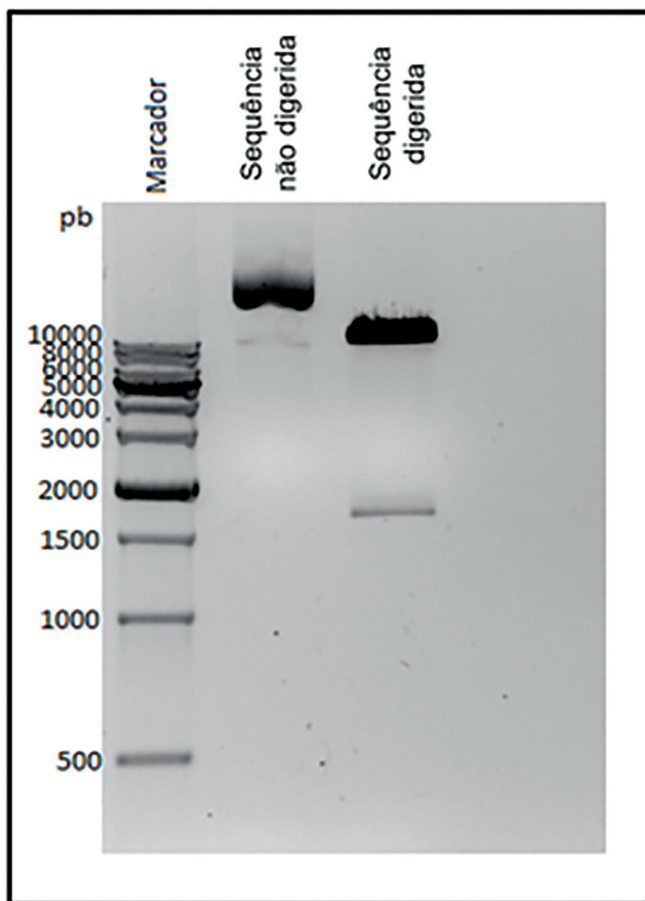
Figura 13. Extração de DNA plasmideal por lise alcalina.



Seguem-se lavagens com etanol ou isopropanol, que precipitam o DNA rapidamente. Lava-se também com etanol 70% para remover resíduos de alguns sais e de SDS. Por fim, o DNA é eluído em água e quantificado por espectrofotometria UV-Vis em comprimento de onda igual a 260 nm. É possível também inferir a pureza da preparação; o DNA absorve radiação UV a 260 nm enquanto proteínas absorvem a 280 nm. A relação A_{260}/A_{280} , se igual ou maior do que 1,8, revela que a preparação é pura. Resultados da relação menor que 1,8 demonstram uma preparação contaminada com proteína.

De posse do DNA recombinante extraído e quantificado, este é submetido à digestão com enzimas de restrição, visando verificar a integridade do vetor, pois, ocasionalmente, o vetor pode sofrer recombinação com o DNA cromossomal, perdendo regiões importantes para seu bom funcionamento (Figura 14).

Figura 14. Vetor digerido com as enzimas *NotI* e *BamHI* para verificação de sua integridade.



PROTOCOLO 3

1. Transformação de bactérias eletrocompetentes com o plasmídeo recombinante e plaqueamento em meio seletivo

- Ligar o eletroporador (Botão lateral > 4) Pré-set Protocol > Enter > 1) Bacterial > Enter > 2) E. coli-2 mm, 2,5 Kv > Enter);
- 50 uL de bactéria eletrocompetente;
- 1 a 2 uL da reação de ligação precipitada;
- Adicionar o volume obtido na cubeta de eletroporação gelada (4 °C);
- Colocar a cubeta no eletroporador, e apertar o botão ‘Pulse’;
- Adicionar à cubeta de eletroporação 1 mL de LB e transferir o volume para um tubo eppendorf de 1,5 mL;
- Incubar em banho seco por 1 h, a 37 °C, sob agitação;
- Centrifugar a 4.000 RPM por 5 min;
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* bacteriano em aproximadamente 500 uL de meio LB;
- Plaquear todo o conteúdo em meio LB-ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina para obtenção de colônias resistentes ao antibiótico;
- Incubar as placas a 37 °C, por cerca de 16~18 h;
- Selecionar colônias bacterianas que cresceram nas placas LB-Amp e expandir em meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina. Incubar os inóculos a 37 °C por 16-18 h sob agitação.

2. Minipreparação de DNA plasmideal

- Inóculos de 5 mL de bactérias podem ser utilizados para a preparação plasmideal em pequena escala;
- Seguir protocolos dos kits disponíveis (Sugestão: Illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit – GE Healthcare).

3. Confirmação da integridade dos plasmídeos

A) Digestão dos plasmídeos:

Reação para volume final de 10 uL:

- X uL do plasmídeo (~500 ng do DNA plasmídeo);
- 1 uL do tampão O (*Thermo Scientific*);
- 0,5 uL (5U) da enzima NOTI 10 U/uL (*Thermo Scientific*, #ER0592);
- 0,5 uL (5U) da enzima EcoRI 10 U/uL (*Thermo Scientific*, #ER0271);
- X uL de água deionizada;
- Incubar por 1 h, a 37 °C.

B) Eletroforese das amostras em gel de agarose 1%:

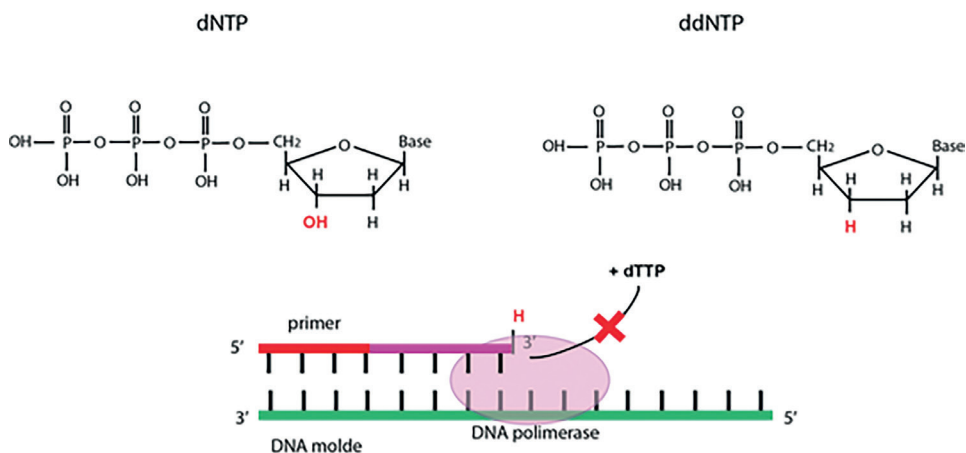
- Pesar 0,5 g de agarose;
- Solubilizar a agarose em 50 mL de tampão TAE 1x;
- Levar ao micro-ondas para completa dissolução da agarose;
- Esperar esfriar e adicionar 2 uL de brometo de etídio (concentração final no gel deve ser 0,2-0,5 µg/mL);
- Adicionar esse conteúdo ao suporte para gel de agarose e esperar o gel polimerizar;
- Colocar o gel na cuba preenchida com tampão TAE 1x;
- Adicionar às amostras, tampão *Loading Dye* (se o tampão estiver 6X, para 20 uL de amostra, adicionar 3,3 uL de tampão, de modo que este fique 1x);
- Iniciar a eletroforese, com voltagem de 100 V, por 60 min.
- OBS: Verificar se as enzimas apresentam atividade ótima no mesmo tampão. Caso não apresentem, deve-se procurar enzimas que apresentam boa atividade no mesmo tampão ou incubar a reação por mais tempo.

CONFIRMAÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE

PREPARO DE AMOSTRAS DE DNA PLASMIDEAL PARA SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS CROMATOGRAMAS

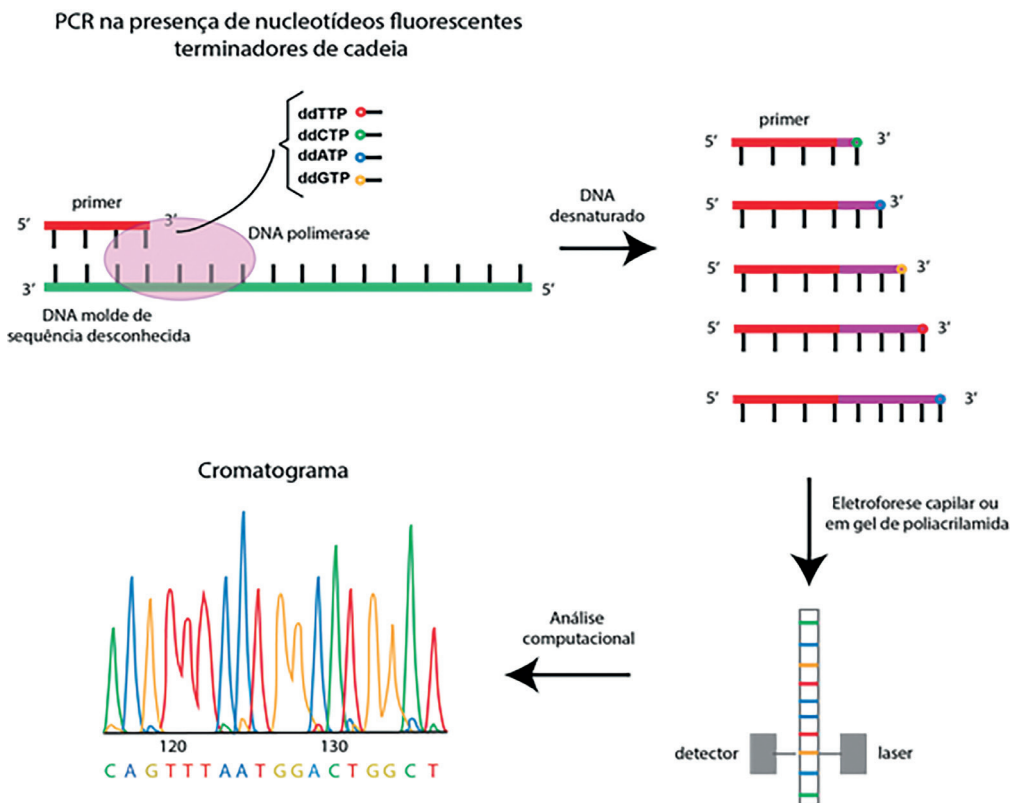
O sequenciamento é necessário para se confirmar a inserção da sequência-guia no vetor. O método mais acessível de sequenciamento, no momento, é o de Sanger, baseado na incorporação de didesoxinucleotídeos (ddNTPs) à cadeia nascente de DNA. Os ddNTPs não possuem o OH- na posição 3', impedindo a ligação do próximo nucleotídeo, causando, assim, a parada de crescimento da cadeia (Figura 15).

Figura 15. Parada de crescimento da cadeia nascente pela adição de ddNTP.



A esses ddNTPs são também acoplados diferentes fluoróforos, de modo que cada base seja diferencialmente identificada. Sendo assim, para a reação de sequenciamento são necessários iniciadores (*primers*), um *template* (amostra), dNTPs, ddNTPs, DNA polimerase e tampão. A reação é feita em termociclador, seguindo condições predeterminadas de temperatura. Antes da análise por eletroforese capilar, as amostras passam por um processo de purificação para retirada de nucleotídeos não incorporados. Em seguida, as amostras são submetidas à eletroforese capilar para separação e identificação dos fragmentos gerados e montagem da sequência de interesse (Figura 16).

Figura 16. Eletroforese capilar para determinação da sequência analisada.



Os cromatogramas gerados podem ser analisados utilizando-se programas específicos, como o Chromas e Seqman.

PROTOCOLO 4

1. Preparo das amostras de DNA para sequenciamento

Reação para volume final de 20 uL:

- X uL DNA (~350 ng do DNA amplificado);
- 2,5 uL Big Dye (*Applied Biosystems*, #4336911);
- 0,5 uL (0,25 uM) do *primer* (10 uM);
- 4 uL Buffer 5X (*Applied Biosystems*, #4339843);
- Fazer um mix com H₂O deionizada, BigDye e o Buffer;
- Adicionar o DNA no fundo do poço;
- Adicionar o *primer* na lateral do poço e bater;
- Adicionar o mix na lateral do poço na placa;
- Cobrir a placa com adesivo adequado;
- Centrifugar na placa utilizando a centrífuga adequada;
- Incubar as amostras no termociclador com a programação a seguir:
 - 1) 95 °C por 2 min
 - 2) 95 °C por 45 seg
 - 3) 55 °C por 30 seg
 - 4) 60 °C por 4 min
 - 5) Repetir passos de 2 a 4 (de 35 a 42 ciclos)
 - 6) Manter a 4 °C até remover a reação do termociclador

2. Reação de precipitação das amostras:

- Centrifugar as amostras após saírem do termociclador;
- Adicionar 1 uL de acetato de sódio 3 M;
- Adicionar 2 uL de glicogênio 20 mg/mL;

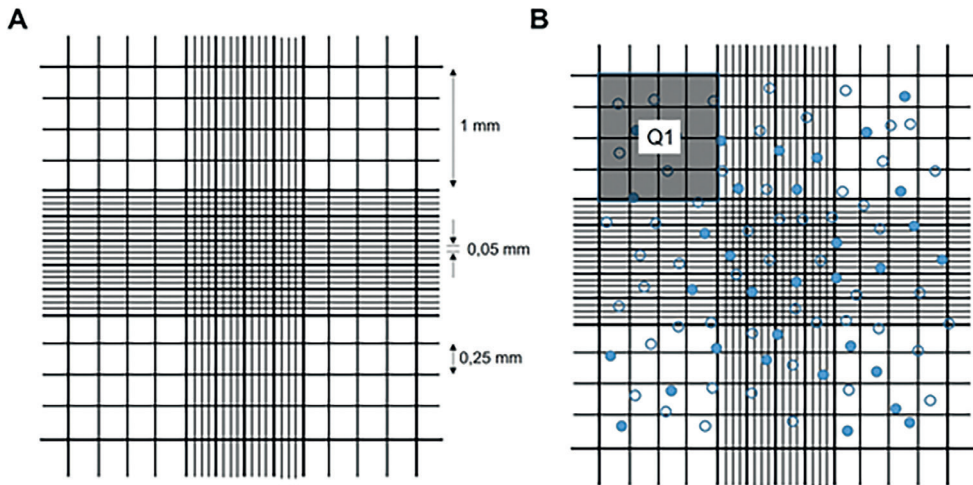
- Adicionar 100 uL de etanol absoluto e misturar no Vortex;
- Incubar a placa por 1 h no freezer (-20 °C);
- Centrifugar a placa por 40 min, a 4.000 RPM, a 4 °C;
- Remover o sobrenadante por inversão rápida e secar em papel;
- Adicionar 200 uL de etanol 70% gelado;
- Centrifugar a placa por 30 min, a 4.000 RPM, a 4 °C;
- Remover o sobrenadante por inversão rápida e secar em papel;
- Evaporar o líquido restante através de incubação no termociclador, por 3 min, a 95 °C;
- Selar com PVC, embalar em papel alumínio e enviar para sequenciamento.

GERAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES NOCAUTEADAS

TRANSFECCÃO DE CÉLULAS 293T, TITULAÇÃO VIRAL, CÁLCULO DA MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO (M.O.I) E TRANSDUÇÃO DA CÉLULA-ALVO

Em determinados experimentos, são utilizadas quantidades determinadas de células, portanto, é necessário quantificá-las. A quantificação celular pode ser feita de maneira direta, utilizando-se a contagem de células na câmara de Neubauer. Essa câmara consiste de uma lâmina contendo nove quadrados que medem 1 mm^2 (Figura 17), mas apenas os quatro quadrados externos são utilizados na contagem celular. Para quantificação das células utilizando-se a câmara de Neubauer, as células devem estar em suspensão, resultante do processo de tripsinização, quando se tratar de células aderentes.

Figura 17. Esquema do aspecto da câmara de Neubauer.



A) Representação da grade de 3 mm x 3 mm da câmara de Neubauer, subdividida em 9 quadrantes de 1 mm cada. B) Em destaque, um quadrante (Q1) com células azul de tripano positivas (células não viáveis) e células azul de tripano negativas (células viáveis).

Após aplicação da suspensão celular à câmara de Neubauer, deve-se colocar uma lamínula sobre a mesma, de modo que as células sejam distribuídas pela câmara. O espaço que se formará entre a lamínula e a câmara será de 0,1 mm, fazendo com que o volume em cada quadrante corresponda a $0,1 \text{ mm}^3$. Assim, as células contadas em um quadrante e contidas em 1 mL, correspondem ao valor de contagem multiplicado pelo fator de correção da câmara que é igual a 10^4 .

Dessa maneira, o número de células por mL de uma suspensão celular é obtido pela equação a seguir. Tendo em mãos o número de células, é possível realizar cálculos para aliquotar, a partir da suspensão celular, o volume correspondente à quantidade de células necessárias para o plaqueamento de diferentes experimentos.

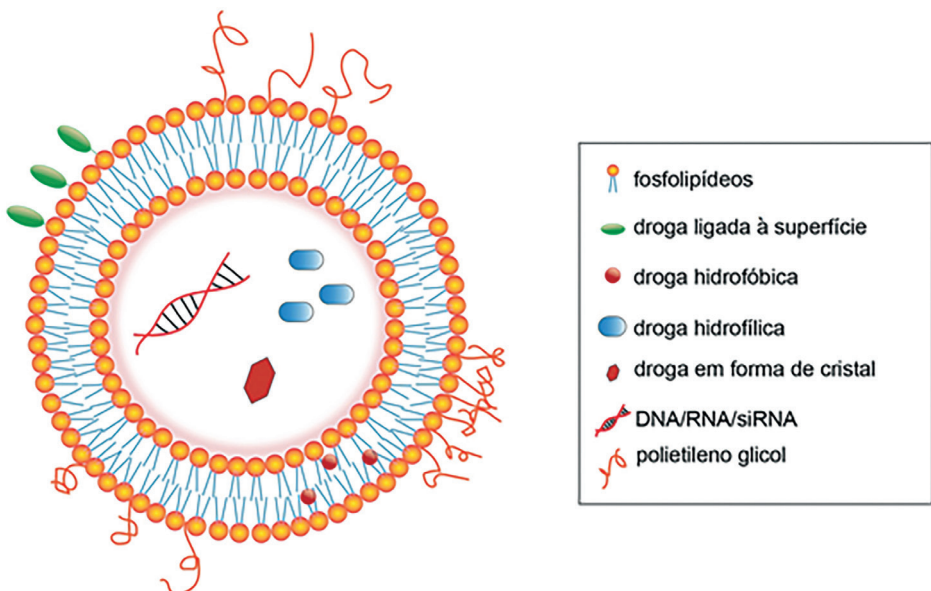
$$\text{Número de células por ml} = (Q1+Q2+Q3+Q4)/4 \times 10^4 \times \text{fator de diluição} \quad (1)$$

Transfecção é um método de transferência gênica que facilita o estudo e controle da expressão gênica. A principal dificuldade encontrada para a inserção de DNA em uma célula é a ultrapassagem da bicamada fosfolipídica da membrana plasmática das células, uma vez que, assim como o DNA, esta também é negativamente carregada, gerando um efeito de repulsão eletrostática. Para contornar essa dificuldade, utiliza-se, principalmente, lipossomos, que são estruturas de caráter anfífilico, sendo constituídos por lipídios, que podem ser

catiônicos ou aniônicos. Portanto, os lipossomos possuem uma região polar, que permite a interação com o DNA, e uma região apolar, que permite sua passagem pela bicamada lipídica (Figura 18). Dessa maneira, torna-se possível a introdução de ácidos nucleicos exógenos, bem como de outras substâncias hidrofílicas, nas células.

No caso particular de transfecção para a produção de partículas virais, são introduzidos diferentes plasmídeos nas células, sendo que cada um é responsável pela produção de um elemento viral. O tipo viral mais utilizado, para transferência gênica, é o lentivírus, que faz parte da família dos retrovírus, tendo, em comum com estes as características de possuir RNA como material genético e utilizar a ação da enzima transcriptase reversa, codificada no genoma viral, para sintetizar DNA a partir de RNA. Os lentivírus são amplamente utilizados para a entrega de material genético por possuírem baixa imunogenicidade, conseguirem transferir grandes sequências para as células-alvo, se integrarem de forma estável do genoma hospedeiro e, por fim, serem capazes de transformar até mesmo células quiescentes (não proliferantes). O uso de diferentes plasmídeos codificando para os diferentes genes virais (gag, pol, env) foi adotado nos sistemas mais avançados de transferência gênica via lentivírus para garantir maior biossegurança, impedindo a geração de partículas virais virulentas.

Figura 18. Estrutura de um lipossomo.



É importante ressaltar que a manipulação de lentivírus, deve ser realizada em instalação que atenda aos parâmetros do nível 2 de biossegurança (NB2), determinados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Além disso, as pessoas que manipulam as partículas lentivirais devem estar devidamente paramentadas e treinadas.

Para que seja possível a produção viral, as células 293T são utilizadas em nosso laboratório, sendo cotransfectadas com quatro plasmídeos diferentes, a saber: a) plasmídeo de empacotamento, que contém os genes gal-pol (responsáveis por codificar as proteínas estruturais do capsídeo viral, a enzima transcriptase reversa e as integrases e proteases virais); b) plasmídeo contendo os genes que codificam proteínas do envelope viral; c) plasmídeo contendo sequências regulatórias virais; e d) plasmídeo contendo a sequência de interesse, chamado de vetor de transferência. Esse vetor de transferência possui a sequência gênica da endonuclease Cas9 e a sequência guia que conduzirá a enzima até o sítio onde se deseja fazer a edição. Uma vez dentro das células, a maquinaria celular se encarrega da montagem das partículas lentivirais.

O meio de cultura contendo as partículas lentivirais é coletado após 24, 48 e 72 h da transfecção. É necessário saber quantas partículas lentivirais foram produzidas, de modo que seja possível adicionar uma quantidade determinada de vírus/célula na etapa de infecção. A esse processo de quantificação viral, dá-se o nome de Titulação Viral. De posse da quantificação viral, a próxima etapa é a determinação da multiplicidade de infecção (M.O.I – *multiplicity of infection*). Essa variável representa quantas partículas lentivirais irão infectar cada célula, ou seja, se é estabelecida uma M.O.I 10, significa que os cálculos realizados serão para que haja 10 partículas lentivirais por célula. Tendo determinado a M.O.I, parte-se para a transdução das células-alvo.

Transdução é o nome dado ao processo através do qual utiliza partículas virais para transferência gênica. Para tanto, os vírus coletados e titulados são colocados em contato com a célula-alvo num volume estabelecido pelo cálculo da M.O.I. Dependendo das características das células a serem transduzidas, é necessário otimizar o processo de transdução, adicionando, por exemplo, uma etapa de centrifugação ao protocolo (espinoculação). Além disso, dependendo da estratégia escolhida para a edição gênica, os vírus que transportam os vetores recombinantes podem ser transduzidos isoladamente (no caso do nocauteamento por inativação gênica) ou podem ser cotransduzidos com diferentes combinações das preparações lentivirais geradas, sendo direcionados às extremidades 5' e 3' do locus do gene-alvo (uma construção GFP positiva + uma construção

resistente à puromicina, por exemplo, no caso de nocauteamento por deleção gênica). Uma vez transduzidas, espera-se que as células passem a apresentar as características genotípicas e fenotípicas conferidas a elas pelo material genético adicionado através do vírus. Por fim, as células transduzidas podem ser selecionadas baseadas na marca de seleção presente no(s) vetor(es) utilizado(s) para a edição gênica.

PROTOCOLO 5

1. Transfecção das células 293T

- Plaquear 1×10^6 células 293T em cada poço de uma placa de 6 poços;
- No dia seguinte, quando a cultura tiver atingido em torno de 80-90% de confluência, preparar a transfecção em dois tubos diferentes da seguinte maneira.

Tubo dos vetores	Tubo da Lipofectamina
150 uL de DME 0% SFB	150 uL de DME 0% SFB
3 ug do vetor de transferência	5 uL de Lipofectamina
0,2 ug do vetor acessório pHGPM2	
0,2 ug do vetor acessório pREV	
0,2 ug do vetor acessório pTAT	
0,4 ug do vetor acessório pVSVG	

- Misturar o conteúdo desses dois tubos em até 5 min;
- Após misturados os volumes desses tubos, aguardar por 20 min para a formação dos complexos lipossomos/DNA;
- Aplicar todo o volume resultante sobre a camada de células 293T, por gotejamento, tomando cuidado para não desfazer a monocamada;
- O volume total de meio de cultura deve ser de 1,5 mL por poço;
- Voltar as culturas para a estufa de CO₂ e trocar o meio após 5 h;
- Realizar coletas do meio contendo as partículas virais após 24, 48 e 72 h;

- As amostras de vírus coletadas podem ser combinadas (o meio coletado após 48 h apresenta maior conteúdo viral) e centrifugadas a 14.500 RPM por 5-10 min a temperatura ambiente para eliminar restos celulares;
- Em seguida, os sobrenadantes, contendo as partículas virais, devem ser filtrados para evitar que células 293T remanescentes contaminem a cultura celular que será transduzida;
- Para isso, usar filtros hidrofílicos com poros de 0,45 μm (exemplos: acetato de celulose, nitrato de celulose, polietersulfona (PES), PVDF);
- Depois de filtrada, as amostras podem ser aliquotadas e congeladas a -80°C até o momento em que serão utilizadas.

2. Titulação Viral e Cálculo da Multiplicidade de Infecção (M.O.I)

- Plaquear 1×10^5 células 293T em cada poço de uma placa de 6 poços;
- Realizar diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} a partir do estoque viral original:

Diluição 10^{-1} : 90 uL de PBSA + 10 uL de vírus estoque;

Diluição 10^{-2} : 90 uL de PBSA + 10 uL da diluição 10^{-1} ;

Diluição 10^{-3} : 90 uL de PBSA + 10 uL da diluição 10^{-2} ;

- Adicionar 20 uL do vírus estoque e 20 uL de cada diluição aos poços da placa já contendo 480 uL de meio com as células (se preferir, pode misturar células, meio e vírus em tubos eppendorfs e depois adicionar os 500 uL resultantes aos poços da placa);
- Trocar o meio 24 h depois;
- Fixar as células, no mínimo, 48 h depois da transdução (para vetor contendo marca de seleção GFP) ou, 10 dias depois da transdução (para vetor contendo marca de seleção de resistência à puomicina);
- Realizar leitura no citômetro para determinação da porcentagem de células GFP positivas;
- Realizar contagem manual do número de colônias resistentes a puomicina;

- De posse da porcentagem de células GFP-positivas e do número de colônias resistentes a puromicina, utilizar a equação a seguir para se obter o título viral em cfu/mL (*colony-forming units per milliliter*):

$$\text{Título (UFC)} = (P \times N / 100 \times V) \times /DF \quad (2)$$

Onde:

P = % de células GFP+ ou nº de colônias resistentes a puromicina

N = número de células no momento da transdução (Ex: 1×10^5)

V = volume da diluição usado para a transdução

DF = fator de diluição

3. Transdução viral da célula-alvo

- Utilizar M.O.I de 10 para cada preparação lentiviral. A M.O.I de 10 é extremamente importante para o sucesso do processo de transdução;
- Preparar suspensão contendo 5×10^3 células/mL para serem plaqueadas em um poço de uma placa de 48 poços;
- Realizar a transdução ou cotransdução, unindo as células-alvo e as partículas virais contendo o vetor(es) recombinante(s);
- O volume total de célula + vírus deve ser de até 500 uL, facilitando, desta forma, a infecção das células pelo vírus;
- Fechar a placa com Parafilm;
- Sedimentar na estufa de CO₂ por 10 min;
- Centrifugar a P48 por 2 h, a 37 °C, 1.200 RPM (espinoculação);
- No dia seguinte, trocar o meio condicionado contendo os vírus por meio fresco;
- A visualização da fluorescência das células transduzidas será possível em, no mínimo, 48 h. As células GFP-positivas podem ser selecionadas por citometria;
- Para as células transduzidas com os vetores contendo a marca de seleção de resistência à puromicina, adicionar a concentração ideal da puromicina 48 h após a transdução para dar início ao processo de seleção.

CONFIRMAÇÃO DA EDIÇÃO GÊNICA (NOCAUTEAMENTO)

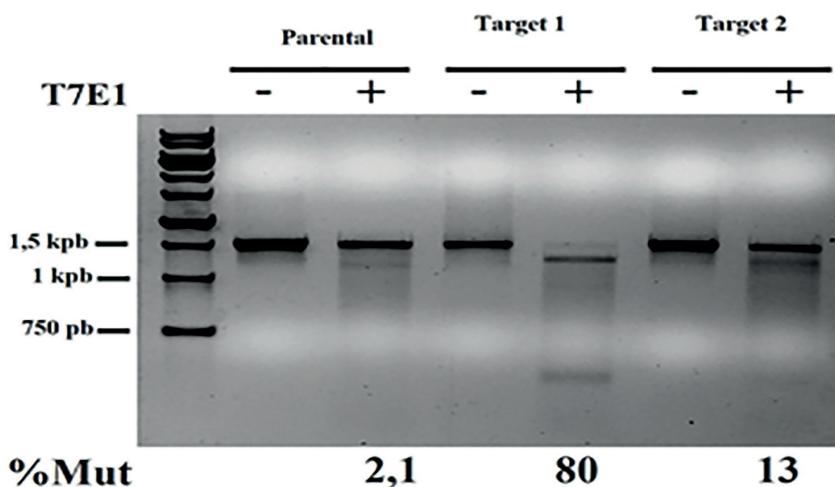
ENSAIO SURVEYOR, ENSAIO POR TIDE, PCR
QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QRT-PCR),
PCR GENÔMICO, WESTERN-BLOTTING E
SEQUENCIAMENTO DE SANGER

No tocante à ferramenta CRISPR/Cas9, é de extrema importância a realização de experimentos que confirmem a edição gênica pela endonuclease Cas9. As técnicas utilizadas para esse fim podem envolver o Ensaio Surveyor (que utiliza a enzima T7 endonuclease), o Ensaio por TIDE (*tracking of indels by decompositions*), o PCR do DNA genômico, o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), o *western blotting* e o Sequenciamento de Sanger.

Para confirmação do nocauteamento por inativação gênica, as técnicas de confirmação mais indicadas são o ensaio Surveyor e o ensaio por TIDE. O ensaio Surveyor, baseia-se no fato de que a enzima T7 endonuclease reconhece pareamentos errôneos de bases, clivando a sequência no sítio onde estes ocorrem. Após extrair o DNA genômico das células que sofreram a edição, o material é submetido à amplificação por PCR. Em seguida, o produto de PCR passa por vários ciclos de desnaturação e anelamento, juntamente com o DNA

amplificado a partir das células que não sofreram edição (células parentais). Espera-se que as regiões editadas não façam um pareamento perfeito com a sequência selvagem, gerando regiões de *mismatch*, que serão reconhecidas e clivadas pela T7 endonuclease. Os fragmentos gerados podem ser vistos através de eletroforese em gel de agarose (Figura 19).

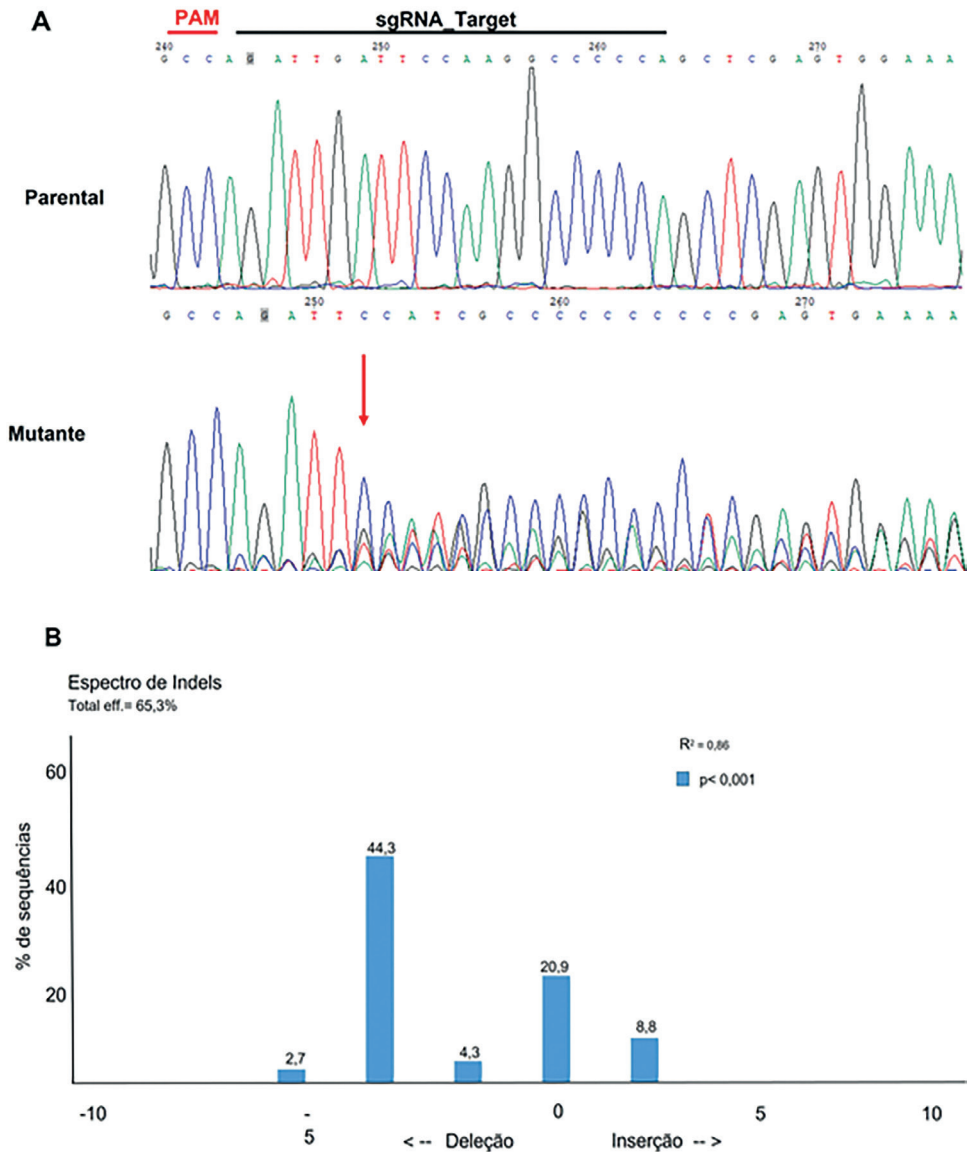
Figura 19. Confirmação da edição gênica através do tratamento com a enzima T7 endonuclease.



Dependendo das características da edição gênica, se as alterações forem muito homogêneas, por exemplo, a polimerase T7 tem dificuldade para reconhecê-las, gerando um falso-negativo. Para contornar esse problema, pode-se utilizar uma outra ferramenta de confirmação, o TIDE (*tracking of indels by decompositions*). Essa ferramenta é um *software* livre que utiliza algoritmos para analisar e decompor os cromatogramas advindos do sequenciamento, comparando os picos gerados pela análise das células parentais com aqueles gerados pela análise das células editadas (Figura 20A).

Com essa comparação, o *software* fornece a porcentagem e a natureza da edição, informando quantos nucleotídeos foram inseridos ou deletados (Figura 20B).

Figura 20. A) Comparação entre os cromatogramas das células parentais e editadas por TIDE. B) Porcentagem de inserções e/ou deleções (*indels*) propiciadas pelo TIDE.

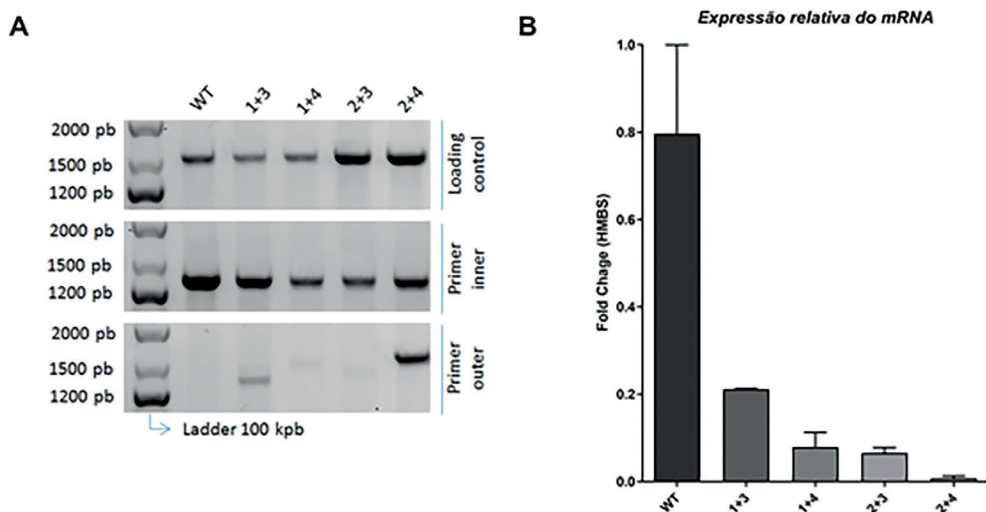


Para a confirmação do nocauteamento por deleção gênica, as técnicas mais indicadas são o PCR do DNA genômico, o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) e o *western blotting*. No PCR genômico, para verificar a integridade

da sequência genômica-alvo, o DNA genômico das linhagens parentais, controles e editadas é extraído utilizando-se kits específicos (*Illustra Tissue & Cells GenomicPrep Mini Spin Kit – GE Healthcare*, por exemplo) e a deleção gênica é confirmada submetendo as amostras a PCR genômico (95 °C por 4 min; 30 ciclos de 95 °C de 45 seg, 60 °C por 45 seg e 72 °C por 2 min; 72 °C por 5 min), utilizando-se três grupos de *primers*: um grupo de *primers* controles (F+R), referente a um gene de expressão constitutiva; um grupo de *primers inners* (F+R), desenhados na região interna do locus gênico alvo da edição; e, por fim, um grupo de *primers outers* (F+R), desenhados na região externa do locus gênico alvo da edição. A ausência de amplificação do *primer inner* e a presença de amplificação do primer outer na linhagem editada com a combinação de gRNAs confirmam a deleção gênica (Figura 21A).

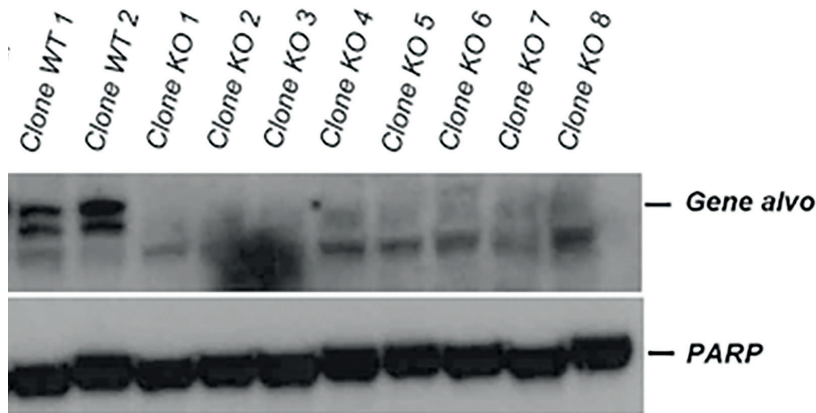
No PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), através do qual verifica-se a expressão do mRNA da sequência genômica-alvo, o RNA total das linhagens parentais, controles e editadas é extraído, utilizando-se kits específicos (*RNeasy Mini Kit – QIAGEN*, por exemplo) e reações de qRT-PCR são realizadas. Para isso, alíquotas do RNA extraído são submetidas à transcrição reversa e síntese de cDNA de fita simples, por meio da ação da enzima transcriptase reversa *SuperScript III* (Invitrogen). Os cDNAs sintetizados são então utilizados como *template* para as reações de qRT-PCR em um termociclador, em condições específicas e predeterminadas. A ausência de expressão do gene-alvo na linhagem editada é mais uma forma de confirmação da deleção gênica (Figura 21B).

Figura 21. A) PCR genômico do gene-alvo nas linhagens parental e editadas. B) Análise da expressão do gene-alvo por qRT-PCR nas linhagens parental e editadas.



Uma outra forma de confirmar o nocauteamento é através da técnica do *western blotting*, na qual verifica-se a expressão proteica da sequência genômica-alvo. A ausência da expressão da proteína, codificada pelo gene alvo, na linhagem editada é mais um indicativo de que a deleção gênica foi alcançada com êxito (Figura 22). Todas as técnicas citadas anteriormente possuem pontos positivos e negativos, mas é indiscutível que a mais eficaz e segura é o Sequenciamento de Sanger, técnica de rotina amplamente utilizada na Biologia Molecular que permite sequenciar os fragmentos de DNA individualmente, revelando a ordem exata da sequência de bases do mesmo.

Figura 22. Seleção de clones celulares *knockouts* por *Western-Blotting* do gene-alvo.



Nesse caso, a proteína PARP foi utilizada como controle interno.

PROTOCOLO 6

Para as etapas de validação utilizando o Ensaio Surveyor (1), Ensaio por TIDE (2) e validação por PCR genômico (3), o primeiro passo envolve a extração de DNA. Nessa etapa, pode-se utilizar kits de extração de DNA (sugestão: *Illustra Tissue & Cells GenomicPrep Mini Spin Kit – GE Healthcare*). Alternativamente, apresentamos aqui um protocolo simples e de baixo custo que possibilita a extração e a purificação de DNA genômico sem a utilização de kits.

- Preparar 50 mL de tampão de lise de acordo com a tabela a seguir (a solução estoque pode ser mantida à temperatura ambiente por meses)

	Concentração inicial	Concentração final	Volume necessário
Tris HCl pH 8.0	1 M	100 mM	5 mL
EDTA	0,5 M	5 mM	0,5 mL
SDS	10%	0,2%	1 mL
NaCl	2,5 M	200 mM	4 mL
H ₂ O estéril			39,5 mL

- Extração de DNA bruto
 - Adicionar Proteinase K (estoque de 20 mg/mL) 1:100 (concentração final 200 µg/mL);
 - Ressuspender o pellet celular em 300 µL de tampão de lise + Pro K para $1-2 \times 10^6$ células;
 - Homogenizar o pellet utilizando o vortex;
 - Incubar as células no termociclador a 60 °C por 2-4 h, 800 RPM;
 - Desativar a enzima a 95 °C por 5 minutos;
 - Nesse ponto, você pode partir diretamente para o PCR ou prosseguir para a purificação com etanol.
- Purificação de DNA
 - Adicionar 30 µL de acetato de sódio (NaOAc) 3 M a pH 5,6 (pH 4,5 também funciona);
 - Adicionar 1.000 µL de etanol a 95%;
 - Agitar vigorosamente por 30 segundos com a mão;
 - Armazenar em -80 °C por 30 minutos durante a noite (mais tempo = maior rendimento);
 - Centrifugar 30 minutos a 2 °C (se possível, ou 4 °C é bom) em velocidade total (14.000 RPM ou superior);

- Você deve ver o pellet de DNA;
- Descartar o sobrenadante (despejando-o);
- Adicionar 500 µl de EtOH 70% (temperatura ambiente) e despejar após 30 segundos;
- Colocar as amostras (invertidas) em papel absorvente para o etanol secar;
- Esperar alguns minutos até que o etanol desapareça completamente;
- Não se preocupar muito com a secagem excessiva;
- Adicionar 50 µl ddH₂O/tampão de eluição;
- Agitar por 30 minutos a 56 °C (800 RPM) para ressuspender;
- Se necessário, quantificar o DNA com auxílio de um espectrofotômetro.

1. Ensaio Surveyor (T7 Endonuclease I)

- Extrair o DNA genômico (gDNA) das células parentais, controles e editadas;
- Quantificar os gDNAs com auxílio de um espectrofotômetro;
- Avaliar o perfil de fragmentação dos gDNAs por eletroforese em gel de agarose 1%;
- Obter sequência FASTA do gene-alvo no NCBI;
- Desenhar *primers forward* e *reverse* com auxílio do programa SnapGene, tendo, como base, a região da possível edição gênica;
- Amplificar a região alvo dos gRNAs através de PCR;
- Avaliar a amplificação por eletroforese em gel de agarose 1%;
- Extrair o DNA amplificado do gel (Sugestão de Kit: *QIAquick Gel Extraction Kit* – Qiagen);
- Submeter o produto da amplificação à hibridização, seguida por digestão com a enzima Surveyor, (Sugestão de Kit: *Surveyor Mutation Detection Kits* – Integrated DNA Technologies), de acordo com instruções do fabricante;

- Avaliar a digestão dos produtos por eletroforese em gel de agarose 1%;
- Analisar a densitometria dos fragmentos através do programa Image-Quant (*Molecular Devices*);
- Calcular a porcentagem de eventos de NHEJ, indicativo de edição, utilizando a seguinte fórmula: % de eventos de corte = $100 \times [1 - (1 - \text{fração clivada})^{(1/2)}]$, onde a fração clivada é definida como (densidade dos produtos digeridos) / (densidade dos produtos digeridos + banda parental não digerida);
- A enzima Surveyor é capaz de clivar apenas os produtos de PCR das amostras que foram editadas.

2. Ensaio por TIDE

- Extrair o DNA genômico (gDNA) das células parentais, controles e editadas;
- Quantificar os gDNAs com auxílio de um espectrofotômetro;
- Avaliar o perfil de fragmentação dos gDNAs por eletroforese em gel de agarose 1%;
- Amplificar a região alvo dos gRNAs por PCR, utilizando *primers* específicos;
- Avaliar a amplificação por eletroforese em gel de agarose 1%;
- Extrair o DNA amplificado do gel (Sugestão de Kit: *QIAquick Gel Extraction Kit – Qiagen*);
- Submeter as amostras ao Sequenciamento de Sanger;
- Comparar, utilizando a ferramenta online TIDE, os cromatogramas obtidos a partir do sequenciamento das células parentais e das células editadas. O *software* irá fornecer a porcentagem e a natureza da edição, informando quantos nucleotídeos foram inseridos ou deletados.

3. PCR Genômico

- Extrair o DNA genômico das células parentais, controles e editadas;
- Quantificar os gDNAs com auxílio de um espectrofotômetro;
- Avaliar o perfil de fragmentação dos gDNAs por eletroforese em gel de agarose 1%;
- Desenhar *primers Inner* e *Outer*;
- Submeter as amostras a PCR genômico (reação a seguir);
- Avaliar a amplificação dos produtos por eletroforese em gel de agarose 1%;
- A ausência de amplificação a partir do *primer inner* e a presença de amplificação a partir do *primer outer* na linhagem editada com a combinação de gRNAs confirmará a deleção gênica;

Reação para volume final de 25 uL:

- X uL do DNA (~100 ng do DNA genômico);
- 0,2 uL (1U) da enzima Taq Polimerase Invitrogen (5 U/uL);
- 2,5 uL (1x) do Buffer (10X);
- 1 uL (2 mM) do $MgCl_2$ (25 mM);
- 1 uL (0,4 uM) do *primer* Forward (10 uM);
- 1 uL (0,4 uM) do *primer* Reverse (10 uM);
- 0,5 uL (0,2 mM) do dNTPs (10 mM);
- X uL de água deionizada;
- Incubar as amostras no termociclador e submetê-las à seguinte programação: 95 °C por 4 min; 30 ciclos de 95 °C de 45 seg, 60 °C por 45 seg e 72 °C por 2 min; 72 °C por 5 min; 4 °C até a remoção da placa do termociclador).

4. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

- Extrair o RNA total das células parentais, controles e editadas (Sugestão de Kit: *RNeasy Mini Kit – QIAGEN*);
- Quantificar os RNAs com auxílio de um espectrofotômetro;
- Sintetizar o cDNA fita simples utilizando a enzima SuperScript III (*Invitrogen*), de acordo com instruções do fabricante;
- Submeter as amostras a reações de qRT-PCR utilizando um termociclador (Sugestão: *Termociclador ViiA7 Real-Time PCR System – Applied Biosystems*);
- Determinar a eficiência dos *primers* (Ef);
- Determinar a diferença entre a média dos Cts da amostra referência e a média dos Cts da amostra estudada (ΔC_p);
- Calcular o fator de normalização através da análise da expressão dos genes endógenos utilizados no experimento;
- Confirmar a expressão diferencial utilizando a fórmula a seguir:

$$\text{Razão} = (\text{Ef (gene alvo)}^{\Delta C_p \text{ (gene alvo)}}) / \text{Fator de normalização}$$

5. Western blotting

- Obter os extratos proteicos a partir das células parentais, controles e editadas, incubando as células em tampão de lise RIPA contendo inibidor de protease;
- Determinar a concentração de proteínas (Sugestão de método: Bradford, utilizando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina);
- Fracionar alíquotas dos extratos proteicos por eletroforese em gel SDS-PAGE;
- Transferir o conteúdo do gel para membrana de nitrocelulose;
- Incubar a membrana em solução de bloqueio (5% leite desnatado ou solução vegetal, dependendo dos anticorpos que serão utilizados);

- Incubar a membrana com os anticorpos específicos e com o anticorpo contra a proteína endógena;
- Revelar a membrana utilizando conjugado IgG-Peroxidase (a membrana deve ser incubada com anticorpo conjugado à peroxidase, lavada 4X com tampão TBS-T, o substrato da peroxidase é adicionado e, por fim, a membrana pode ser revelada no equipamento Image Quant Las 4000 Mini).

REFERÊNCIAS

Alberts DB, et al. **Biologia molecular da célula**. 4º edição. Artmed, 2004.

Almeida M. **Estratégia de inibição da proliferação celular da linhagem Hs578T derivada de tumor mamário humano através do nocauteamento duplo dos genes *CHD4* e *SETDB1* por CRISPR-Cas9**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. Programa Interunidades em Biotecnologia. São Paulo, 2020.

Almeida M, Sogayar MC, Demasi MAA. **Evidence of synthetic lethality interaction between SETDB1 histone methyltransferase and CHD4 chromatin remodeling protein in a triple negative breast cancer cell line**. Submetido à Bioscience Reports.

Alves EA, Guimarães ACR. **Conceitos e Métodos - Cultivo celular**. Repositório institucional da Fiocruz, 2010.

Barrangou R, Marraffini LA. **CRISPR-Cas Systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity**. Volume 54. Molecular Cell, 2014. p: 234-244.

Bloom MV, Freyer GA, Micklos DA. **Laboratory DNA Science: an introduction to recombinant DNA techniques and methods of genome analysis.** The Benjamin/Cummings Publ.Co.Inc, 1996.

Brezgin S, Kostyusheva A, Kostyusheva D, Chulanov V. **Dead Cas systems: Types, principles and applications.** Volume 6041. International Journal of Molecular Sciences, 2019.

Brinkman EK, et al. **Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition.** Volume 42. Nucleic Acids Research, 2014.

Brinkman EK, Steensel B. **Rapid quantitative evaluation of CRISPR genome editing by TIDE and TIDER.** CRISPR Gene Editing. Humana Press, New York, NY, 2019. P. 29-44.

Brocken DJW, Tark-Dame M, Tark-Dame R. **dCas9: A versatile tool for epigenome editing.** Volume 26. Current Issue in Molecular Biology, 2018. P: 15-32.

Brown, Terence A. **Gene cloning and DNA analysis: an introduction.** Wiley-blackwell, 2020.

Chen JS, Doudna JA. **The chemistry of Cas9 and its CRISPR colleagues.** Volume 1. Nature Reviews Chemistry, 2017, p: 1-15.

CropLife Brasil. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/conceitos/crispr-a-surpreendente-tecnica-de-edicao-genetica/>. Acesso em: 15/04/2021.

Deocesano-Pereira C, Machado RAC, De Jesus-Ferreira HC, Marchini T, Pereira TF, Carreira ACO, Sogayar MC. **Functional impact of the long non-coding RNA MEG3 deletion by CRISPR/Cas9 in the human triple negative metastatic Hs578T cancer cell line.** Volume 18. Oncology. Letter, 2019. p: 5941-5951.

Doudna JA, Charpentier E. **The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9.** Volume 346. Science, 2014. p: 1258096-1258096.

Gao X, et al. **Treatment of autosomal dominant hearing loss by in vivo delivery of genome editing agents.** Volume 553. Nature Research Letter, 2018. p: 217-221.

Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. **History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology.** Volume 200. Journal of Bacteriology, 2018. p: 1-17.

- Ishino Y, et al. **Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product.** Volume 169. Journal of Bacteriology, 1987. p: 5429-5433.
- Jansen R, et al. **Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.** Volume 43. Molecular Microbiology, 2002. p: 1565-1575.
- Klug WS, Cummings MR, Spencer CA, Palladino MA. **Conceitos de Genética.** 9. ed. Artmed; 2010.
- Lewin, B. **Genes IX.** 9. ed. Artmed; 2008.
- Li Y, et al. **Genome-wide CRISPR screen for Zika virus resistance in human neural cells.** Volume 116. PNAS, 2016. p: 9527-9532.
- Lima LM. **Conceitos básicos em técnicas de biologia molecular.** Embrapa, 2008.
- Ma H, et al. **Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos.** Volume 548. Nature, 2017. p: 413-419.
- Martin J, et al. **A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.** Volume 337. Science, 2012. p: 816-821.
- Mojica FJM, Rodriguez-Valera F. **The discovery of CRISPR in archaea and bacteria.** Volume 283. The FEBS Journal, 2016. p: 3162-3169.
- Mojica FJM, Juez G, Rodriguez-Valera F. 1993. **Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites.** Volume 9. Molecular Microbiology, 1993. p: 613-621.
- Mojica FJM, et al. **Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements.** Volume 60. Journal of Molecular Evolution, 2005. p: 174-182.
- Mondell C, et al. **Suppression of female in *Aedes aegypti* with a CRISPR-targeted male-sterile mutation.** Volume 118. PNAS, 2021. e2105075118.
- Pereira, TC. **Introdução à técnica de CRISPR.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética (2016).
- Petazzi P, et al. **Robustness of catalytically dead Cas9 activators in human pluripotent and mesenchymal stem cells.** Volume 20. Molecular Therapy: Nucleic acids, 2020. p: 196-203.

Pourcel C, et al. **CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA and provide additional tools for evolutionary studies.** Volume 151. Microbiology, 2005. p: 653-663.

Raffener P, et al. **An MXD1-derived repressor peptide identifies noncoding mediators of MYC-driven cell proliferation.** Volume 117. PNAS, 2020. p: 6571-6579.

Revista Pesquisa FAPESP. Edição 240. Fev/2016.

Sander J D, Keith J J. **CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes.** Volume 32. Nature Biotechnology, 2014. p: 347-355.

Sedeek KEM, Mahas A, Mahfouz M. **Plant genome engineering for targeted improvement of crop traits.** Volume 10. Frontiers in Plant Science, 2019.

Sentmanat MF, et al. **A survey of validation strategies for CRISPR-Cas9 editing.** Volume 8. Scientific Reports, 2018.

Strachan T, Read A. **Genética molecular humana.** Artmed Editora, 2016.

Tenório LZ, Silva FH, Han SW. **A potencialidade dos lentivírus na terapia gênica.** Volume 6. Revista Brasileira de Clínica Médica, 2008. p:260-267.

TIDE: Tracking of Indels by Decomposition. Disponível em: <http://shinyapps.org/datacurators.nl/tide/>

Uyhazi KE, Bennett J. **A CRISPR view of the Nobel Prize in Chemistry.** Volume 131. The Journal of Clinical Investigation, 2021. e145214.

Wang H, Sun W. **CRISPR-mediated targeting of HER2 inhibits cell proliferation through a dominant negative mutation.** Volume 385. Cancer Letters, 2017. p: 137-143.

Westermann L, Neubauer B, Köttgen M. **Nobel Prize 2020 in Chemistry honors CRISPR: a tool for rewriting the code of life.** Volume 473. European Journal of Physiology, 2021. p: 1-2.

Zhang C, Xiao B, Jiang Y, Zhao Y, Li Z, Gao H, et al. **Efficient editing of malaria parasite genome using the CRISPR/Cas9 system.** Volume 5. MBio, 2014.e01414-14.

Zhang Y, et al. **The emerging and uncultivated potential of CRISPR technology in plant science.** Volume 5. Nature Plant, 2019. p: 778-794.

Zhou M, et al. **CCR5 is a suppressor for cortical plasticity and hippocampal learning and memory.** eLIFE. Volume 5, 2016. e20985.

AUTORES

MARIELE SANTOS MORAES-ALMEIDA

Licenciada em Ciências, com ênfase em Química, pela Universidade Federal de São Paulo. Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

HENRIQUE CÉSAR JESUS-FERREIRA

Licenciado e Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Doutor em Bioquímica pela Universidade de São Paulo.

CAMILA LEAL-LOPES

Bacharel em Química pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Doutora em Bioquímica pela Universidade de São Paulo. Cientista associada ao New Mexico Consortium.

ANA CLAUDIA OLIVEIRA CARREIRA

Pesquisadora Colaboradora da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e do Grupo NUCEL de Terapia Celular e Molecular. Doutorado em Bioquímica pela Universidade de São Paulo; Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos.

MARI CLEIDE SOGAYAR

Professora Titular Colaboradora do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e Coordenadora do Grupo NUCEL de Terapia Celular e Molecular. Mestre pela Universidade da Califórnia. Doutorado em Bioquímica pela Universidade de São Paulo.

RAQUEL ARMINDA CARVALHO MACHADO

Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa. Mestre em Ciências pelo Instituto Federal de Tecnologia Suíça. Doutora em Bioquímica pela Universidade de São Paulo.



Este livro foi elaborado por ex-alunos e colaboradores do Grupo NUCEL de Terapia Celular e Molecular da USP, com o objetivo de facilitar a compreensão e aplicação da técnica revolucionária de Edição Genética CRISPR/Cas9.

Na parte introdutória, abordamos desde a descrição inicial do locus CRISPR (do inglês Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats) até a descoberta do mecanismo de funcionamento e o desenvolvimento de formas adaptadas deste sistema para edição gênica direcionada e precisa do genoma de diversos organismos. Em seguida, apresentamos, detalhadamente, o passo a passo de como realizar uma edição gênica de maneira prática e confiável, através do sistema CRISPR/Cas9.



openaccess.blucher.com.br



Blucher Open Access