



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
CURSO DE FARMÁCIA**



LUCAS EVANGELISTA DA PAIXAO

TERAPIA GÊNICA NO TRATAMENTO DE DOENÇAS

**OURO PRETO
MINAS GERAIS - BRASIL
2019**

LUCAS EVANGELISTA DA PAIXAO

TERAPIA GÊNICA NO TRATAMENTO DE DOENÇAS

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Federal de Ouro
Preto (UFOP) como parte das exigências para
a conclusão do curso de Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Glenda Nicioli da Silva.

OURO PRETO
MINAS GERAIS - BRASIL
2019

P167t Paixão, Lucas Evangelista da .
Terapia gênica no tratamento de doenças [manuscrito] / Lucas Evangelista da Paixão. - 2019.

51f.: il.: color; tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glenda Nicioli da Silva.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Enzimas. 2. Terapia gênica. 3. Genes. I. Silva, Glenda Nicioli da. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 604.4:557.15

Catálogo: ficha.sisbin@ufop.edu.br



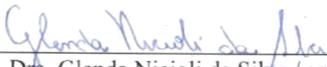
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

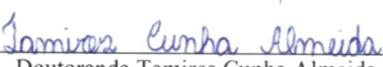
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

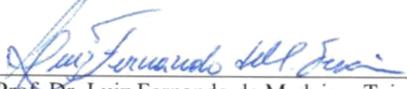
Escola de Farmácia



ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 449ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 09 dias do mês de julho de dois mil e dezenove, terça-feira, realizou-se, a partir das 14 horas, na sala de reuniões da Escola de Farmácia, no Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia do candidato ao grau de Farmacêutico Generalista, **Lucas Evangelista da Paixão**, matrícula **13.2.2328**, intitulada **“Terapia gênica no tratamento de doenças”**. A Banca Examinadora foi constituída pela doutoranda Tamires Cunha Almeida, CIPHARMA/EF/UFOP, pelo Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira, DEACL/EF/UFOP e pela orientadora Profª. Dra. Glenda Nicioli da Silva, DEACL/EF/UFOP. De acordo com o regulamento do Curso, a orientadora, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra ao candidato, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa do candidato. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do candidato e do público, tendo deliberado pela sua aprovção, com a NOTA 9,0. Comunicou-se à candidata que essa nota somente será liberada para a PROGRAD, após a entrega do exemplar definitivo de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema de Bibliotecas e Informação (Sisbin), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com as devidas correções sugeridas pela banca e com o aval escrito da orientadora. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada por Gustavo Franco Campos, secretário do Colegiado de Farmácia, que após a leitura pública da mesma seguirá assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela Diretora da Escola de Farmácia. Ouro Preto, 09 de julho de 2019.


Profª. Dra. Glenda Nicioli da Silva / orientadora


Doutoranda Tamires Cunha Almeida


Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira


Profª. Dra. Maria Elisabete da Silva Barros
Diretora da Escola de Farmácia

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Aparecida Gregório por ser muito mais do que uma mãe, por me apoiar e incentivar nos momentos mais delicados desta jornada. Agradeço a minha avó Maria Alves e ao meu avô José Ângelo (*in memoriam*) por todo cuidado e carinho.

Aos meus amigos de Ponte Nova, Bernardo, Daniel, Frederico, Gustavo, João, Nicolas, Ricardo e Victor por toda descontração, todas as conversas, todos os momentos.

Aos amigos de Ouro Preto por todos momentos de lazer e descontração.

À Republica Pronto Socorro, por me acolher e me ajudar em um dos momentos mais difíceis desta etapa.

À Francielle Xauani por todo carinho, cumplicidade e afeto durante esta fase.

Agradeço à Universidade Federal de Ouro Preto pela oportunidade de me graduar no curso de farmácia. À todo corpo docente, em especial aos professores, Jorge Humberto, Carmem, Simone e Glenda pelas oportunidades. À toda equipe técnica e de funcionários da Escola de Farmácia de Ouro Preto por todos ensinamentos e conselhos repassados.

RESUMO

Terapia gênica é o tratamento baseado na transferência de cópias do material genético sadio ao organismo desejado, propondo a correção do fenótipo de distúrbios causados por anormalidades genéticas. Desde a descoberta do DNA humano e suas respectivas características, pesquisadores vem tentando editá-lo a fim de conseguir modificações específicas em determinadas regiões para expressar um fenótipo desejado.

Com o rápido avanço tecnológico, com as várias descobertas sobre o material genético humano e com a elucidação crescente da função dos genes, várias metodologias capazes de corrigir o genoma humano foram desenvolvidas. A utilização de genes exógenos para suprir uma demanda de produção do organismo e melhorar o prognóstico de doenças através da entrega do transgene por vetores plasmidiais e virais a células hospedeiras foram exploradas.

Atualmente, a capacidade de reparo celular é uma das características que está sendo extensamente estudada para a criação de metodologias capazes de editar o genoma humano. A descoberta de nucleases capazes de gerar uma lesão sítio-específica no DNA possibilitou a criação de metodologias capazes de editar o genoma humano, o que pode dar uma nova esperança de tratamento a doenças. As metodologias atuais e tradicionais capazes de alterar e/ou suplementar o genoma humano são discutidas neste trabalho, correlacionando suas respectivas aplicações a doenças até o presente momento sem cura.

Palavras Chave: CRISPR-CAS9, edição genômica, endonucleases, ferramentas da terapia gênica, terapia gênica, transferência de genes, vetores virais.

ABSTRACT

Gene therapy is the treatment based on the transfer of copies of the healthy genetic material to the desired organism, proposing the correction of the phenotype of disorders caused by genetic abnormalities. Since the discovery of human DNA and their respective characteristics, researchers has been trying to edit it in order to achieve specific modifications to specific regions to express a desired phenotype.

With the rapid technological advancement, with the various discoveries about the human genetic material and with the elucidation of the function of the genes, several methodologies able to correct the human genome were developed. The use of exogenous genes to meet a production demand of the organism and to improve the prognosis of diseases by delivery of the transgene by plasmid and viral vectors to host cells was explored.

Currently, cellular repair capacity is one of the characteristics that is being extensively studied for the creation of methodologies capable of editing the human genome. The discovery of nucleases capable of generating site-specific DNA damage has led to the creation of methodologies capable of editing the human genome, which may give a new hope of treatment to so-called "incurable" diseases. Current and traditional methodologies capable of altering or supplementing the human genome are discussed in this paper, correlating their respective applications to diseases to date without cure.

Keywords: CRISPR, endonucleases, gene therapy, gene transfer, genetic therapy tools, genomic editing, viral vectors.

ABREVIATURAS

AAV	Vírus adenoassociados
ADA	Adenosine deaminase deficiency
CAS	CRISPR associated
CCR5	Receptor de quimiocina C-C tipo 5
CrRNA	CRISPR RNA
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSB	Double strand breaks
DsDNA	Double strand DNA
EMA	European marketing authorization
FDA	Food and drug Administration
HDR	Homologous direct repair
HHV	Human herpesvirus
HIV	Human immunodeficiency virus
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1
HSV	Herpes simplex virus
HSV-1	Herpes simplex virus type 1
NHEJ	Non-homologous end-joining
RNA	Ácido ribonucleico
RNAG	RNA guia
RNAm	RNA mensageiro
RVD	Variable di-residue
SCID	Severe combined immunodeficiency
SCID-X1	X-linked severe combined immunodeficiency
SFDA	State food and drug administration of china
SsDNA	Single strand DNA
TALE	Transcription activator-like effectors
TALEN	Transcription activator-like effector nucleases
TracrRNA	Trans-activating crRNA
ZF	Zinc fingers
ZFN	Zinc fingers nucleases

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Passos da tecnologia do DNA recombinante
- Figura 2 Esquema do processo de transfecção do transgene por microinjeção
- Figura 3 Esquema do processo mediado por eletroporação
- Figura 4 Esquema do processo de transformação mediado por biobalística
- Figura 5 Princípio da geração de um vetor viral
- Figura 6 Mecanismos de reparo celular mediado por HDR e NHEJ
- Figura 7 Exemplo de clivagem pelas ZFN
- Figura 8 Mecanismo de geração de DBS por TALEN,
- Figura 9 Mecanismo natural e projetado da CRISPR e exemplo de um RNAg
- Figura 10 Número de ensaios clínicos aprovados em todo o mundo 1989–2017

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Protocolos clínicos da terapia gênica
Tabela 2	Exemplos de vetores virais aplicados para terapia gênica
Tabela 3	Exemplos de aplicações da edição do genoma para modelos de terapias
Tabela 4	Produtos aprovados para terapia genica
Tabela 5	Vantagens e desvantagens das técnicas de edição do genoma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO GERAL	12
2.1. Objetivos Específicos	12
3. MÉTODOS	13
3.1. Critérios de Seleção	13
4. REVISÃO DA LITERATURA	14
4.1. Terapia Gênica	14
4.1.1. Vetores para a Terapia Gênica	17
4.1.1.1. Plasmidiais	18
4.1.1.1.1. Microinjeção	19
4.1.1.1.2. Eletroporação	19
4.1.1.1.3. Biobalística	21
4.1.1.2. Vetores Virais	22
4.1.1.2.1. Retrovírus	24
4.1.1.2.2. Adenovírus	26
4.1.1.2.3. Vírus Adenoassociados	27
4.1.1.2.4. Vírus da Herpes Humana	27
4.1.2. Edição Genômica	29
4.1.2.1. ZFN	32
4.1.2.2. TALEN	34
4.1.2.3. CRISPR/CAS9	35
4.1.2.4. Comparação entre as técnicas de edição do genoma	38
5. RESULTADOS OBTIDOS COM AS PRINCIPAIS TÉCNICAS.....	40
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
7. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

A descoberta da estrutura da dupla hélice do ácido desoxirribonucleico (DNA) (WATSON; CRICK, 1953) possibilitou que novos avanços tecnológicos fossem realizados posteriormente, o que acabou levando ao desenvolvimento de tecnologias que facilitassem a aplicação da terapia genica (WOLFF; LEDERBERG, 1994). Arthur Kornberg foi o responsável pela descoberta da enzima e das funções da DNA polimerase durante a replicação, degradação e reparo do DNA (LENZER, 2008). No final do ano de 1960, no dia 28 de dezembro, François Jacob e Jacques Monod elucidaram o processo de síntese proteica, na qual a descoberta do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) foi crucial para os avanços biotecnológicos.

Por volta da década de 1970 ocorreu a descoberta das enzimas de restrição que seriam capazes de clivar o DNA em uma ou mais sequencias alvos e da DNA ligase que é a enzima capaz de unir fragmentos de DNA que tenham porções complementares, tornando os fragmentos uma molécula de DNA contínua (ARBER, 1965; LEHMAN, 1974).

Com os avanços na área da biologia molecular, métodos capazes de criar moléculas de DNA recombinante foram sendo desenvolvidos (JACKSON; SYMONS; BERG, 1972; COHEN et al., 1973). Esses avanços levaram a uma revolução na área da biotecnologia e da biologia molecular e serviram como base para a terapia gênica (FRIEDMANN, 1992).

Terapia gênica é a capacidade de modificar, suplementar ou corrigir um material genético através da inserção de genes exógenos a um alvo específico com finalidade terapêutica (NARDI; TEIXEIRA; SILVA, 2002; STRAUSS B.; STRAUSS E, 2015; GONÇALVES, PAIVA, 2017). A terapia gênica mostra-se importante para o tratamento de doenças genéticas e de seus fenótipos observados. Entretanto, ainda há a necessidade de estudos e de legislações para a sua aplicação, uma vez que efeitos adversos ou até mesmo a eficiência da aplicação das técnicas devem ser levados em consideração (LINDEN, 2010; GONÇALVES; PAIVA, 2017). O foco desta revisão é descrever algumas técnicas que partem da premissa de alterar e/ou editar o genoma humano, e enfatizar o tratamento de doenças genéticas.

2. OBJETIVO GERAL

Descrever os métodos moleculares capazes de corrigir e editar o material genético humano para tratamento de doenças genéticas.

2.1. Objetivos Específicos

- Descrever as metodologias tradicionais e atuais para o tratamento de doenças genéticas;
- Descrever os vetores utilizados para a terapia genica;
- Descrever os métodos de edição do genoma humano;
- Evidenciar usos da terapia gênica, relatando sobre resultados obtidos;
- Relatar sobre as perspectivas futuras para tratamentos de enfermidades.

3. MÉTODOS

Este trabalho trata-se de uma revisão bibliográfica em bases de dados científicas, buscando a temática: Terapia gênica, entrega de genes, edição genômica, ensaios clínicos para terapia genica, transferência de genes e ferramentas para edição do genoma, através de termos livres em português e em inglês.

As fases da pesquisa foram: levantamento bibliográfico, leitura e sistematização da bibliografia de referência levantada, construção do referencial teórico, descrição e categorização dos dados e considerações finais.

3.1. Critérios de Seleção

As bases de dados utilizadas foram Pubmed, Lilacs, Google Acadêmico, Periódicos Capes e Scielo. Ao fim das pesquisas em cada base, as referências duplas foram excluídas. Restringiu-se o período de levantamento bibliográfico em 25 anos. Anteriormente a este período, somente os trabalhos mais relevantes para o tema da pesquisa foram utilizados. Restringiu-se o levantamento de dados aos idiomas inglês e português, em função da quantidade de artigos encontrados nessas línguas.

Não houve critérios de exclusão significativos, sendo que todos os artigos que ofereceram informações válidas e complementares foram utilizados.

4. REVISÃO DA LITERATURA

Com a constante evolução das técnicas de biologia molecular do DNA, muitas doenças “ditas sem cura” podem ter a possibilidade de obtenção de cura através de métodos que visam a edição do genoma humano para fins terapêuticos (MISRA, 2013).

Algumas doenças são caracterizadas como monogênicas, por apresentarem apenas um gene associado à manifestação da doença, como a fibrose cística, a hemofilia, a anemia falciforme e a distrofia muscular. Outras doenças apresentam-se como poligênicas ou multifatoriais e, nesses casos, diversos fatores (sejam eles ambientais ou genéticos) estão ligados a origem da doença que irão culminar no fenótipo apresentado. São exemplos de doenças multifatoriais o mal de Alzheimer, o diabetes *mellitus*, a hipertensão arterial e alguns tipos de câncer. Atualmente o tratamento pela terapia genica é apenas direcionado para as doenças monogênicas. As doenças multifatoriais também são elegíveis ao tratamento pela terapia genica, porem em função da sua complexidade e a falta de conhecimento acerca das funções dos genes e da influência dos fatores externos ao material genético humano, este grupo de doenças ainda não está sendo alvo da terapia genica no presente momento (MISRA, 2013; STRAUSS B., STRAUSS E., 2015).

4.1. Terapia Gênica

Terapia gênica é o tratamento baseado na transferência de cópias do material genético sadio ao organismo desejado, propondo a correção do fenótipo de distúrbios causados por anormalidades genéticas (WOLFF; LEDERBERG, 1994; NARDI, TEIXEIRA e SILVA, 2002). Mais especificamente, o termo terapia gênica une a farmacoterapia com os princípios genéticos, implicando no uso de sequências de nucleotídeos para tratar a doença (WOLFF; LEDERBERG, 1994). A capacidade de modificar o material genético humano tem se destacado no campo da medicina desde a descoberta do DNA, criando possibilidades para elucidar a associação de enfermidades com a hereditariedade (TEBAS et al, 2014).

Um dos maiores contribuintes para esta terapia foi o protocolo clínico realizado em 1990 nos EUA, sob a autorização do Food and Drug Administration (FDA). Destinado ao tratamento da imunodeficiência primária, o protocolo foi relativamente bem-sucedido, sem apresentar efeitos colaterais e tendo um dos pacientes praticamente curado da anomalia (BLAESE et al., 1995). Em 1999, a terapia gênica teve um grande revés com a morte de um paciente, após 4 dias do início do tratamento para deficiência de ornitina transcarboxilase.

Neste incidente, houve a falência múltipla de órgãos que pode ter sido provocada por uma resposta imune severa ao vetor utilizado na terapia (MISRA, 2013).

Antes da descoberta da tecnologia do DNA recombinante, que ocorreria em meados dos anos 70-80 (JACKSON; SYMONS; BERG, 1972; FRIEDMANN; STANFIELD, 2001), ocorreu a primeira tentativa de utilizar material genético para tratar doenças. Utilizando o vírus papiloma de Shope como vetor e baseando-se em alguns estudos que relatavam sobre a diminuição dos níveis de arginina sérica em animais, três pacientes que sofriam de hiperargininemia foram tratados visando a diminuição dos níveis de arginina sérica. Entretanto, ao final dos testes, não houve alteração dos níveis de arginina sérica, caracterizando falha no tratamento (TERHEGGEN et al., 1975; FRIEDMANN; STANFIELD, 2001).

Posteriormente, a tecnologia de DNA recombinante foi utilizada para ajudar a compreender como a alteração do material genético em um organismo pode criar novas características ou melhorar as já existentes. Esta tecnologia baseia-se na inserção de fragmentos de DNA de fontes variáveis a uma região alvo de um organismo vivo. A manipulação no genoma do organismo é realizada através da introdução de genes e elementos reguladores ou pela diminuição ou bloqueio da expressão de genes endógenos através da recombinação de genes. Através das enzimas de restrição ocorre a clivagem enzimática para obter diferentes fragmentos de DNA nas regiões alvo específicas chamadas de sítios de restrição. Após este corte serão produzidas extremidades que geralmente são coesivas na sequência do DNA para facilitar a inserção do gene alvo. Na sequência, a DNA ligase unirá os fragmentos de DNA ao gene desejado formando assim o vetor recombinante (KHAN et al., 2016) conforme mostrado na figura 1. Logo, estes vetores devem ser introduzidos a um organismo hospedeiro que podem ser bactérias, fungos e células animais com a finalidade de obter o produto dos genes recombinantes. Com o advento desta tecnologia vários genes puderam ser identificados, cortados, e inseridos ao genoma de outro organismo. Um dos primeiros fármacos a serem produzidos com a utilização desta tecnologia foi a insulina humana (PHAM, 2018).

A introdução de material exógeno a células eucariotas através de sua membrana plasmática é extremamente rara, sendo um mecanismo de defesa do próprio organismo que dificulta a eficiência da técnica (VELLAI; VIDA, 1999). Logo, é necessário um veículo capaz de executar essa entrega do material genético exógeno as células alvo com eficiência (KHAN et al., 2016; FÉCCHIO; MACEDO; RICCI, 2018).

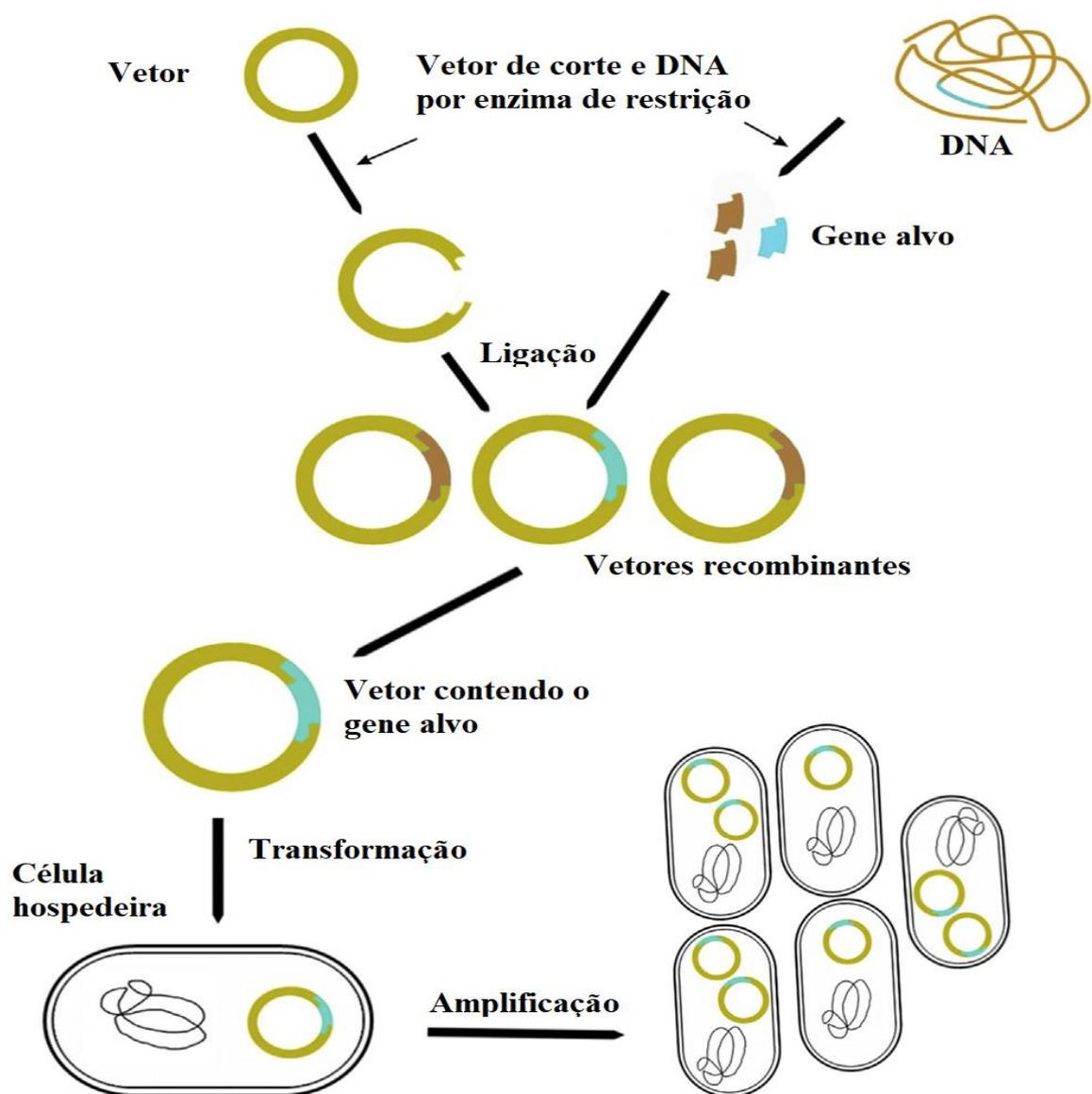


Figura 1: Passos da tecnologia do DNA recombinante
Fonte: PHAM, 2018

Existem várias doenças genéticas que podem ser elegíveis ao tratamento com a terapia genica. Na tabela 1 são mostrados alguns protocolos da terapia gênica, aprovados e publicados, associando a patologia com a técnica de entrega do gene empregado (MISRA, 2013).

Tabela 1: Protocolos clínicos da terapia gênica

Doença	Objetivo	Células alvo	Modo de liberação	de	Países com o protocolo
Deficiência de adenosina desaminase	Substituição da deficiência de adenosina desaminase	Sangue	Retrovírus		Itália, Holanda, Estados Unidos
Deficiência de α 1-antitripsina	Substituição de α 1-antitripsina	Epitélio respiratório	Lipossoma		Estados Unidos
AIDS	Inativação do antígeno de ativação de HIV	Sangue e medula	Retrovírus		Estados Unidos
Câncer	Aprimoramento da função imune	Sangue, medula e tumor	Retrovírus, lipossoma, eletroporação e transferência mediada por células		Áustria, China, França, Alemanha, Itália, Holanda, Estados Unidos
Câncer	Remoção tumoral	Tumor	Retrovírus, transferência mediada por células		Estados Unidos
Câncer	Quimioproteção	Sangue e medula	Retrovírus		Estados Unidos
Câncer	Marcação de células troco	Sangue, medula e tumor	Retrovírus		Canadá, França, Suécia, e Estados Unidos
Fibrose cística	Substituição enzimática	Epitélio respiratório	Adenovírus e lipossoma		Inglaterra e Estado Unidos
Hipercolesterolemia familiar	Substituição de receptores lipoproteicos de baixa densidade	Fígado	Retrovírus		Estado Unidos
Anemia de Fanconi	Liberação de gene de complemento C	Sangue e medula	Retrovírus		Estado Unidos
Doença de Gaucher	Substituição da glucocerebrosidase	Sangue e medula	Retrovírus		Estado Unidos
Hemofilia B	Substituição do fator IX	Fibroblastos da pele	Retrovírus		China
Artrite reumatoide	Liberação de citocina	Membrana sinovial	Retrovírus		Estado Unidos

Fonte: MISRA, 2013

4.1.1. Vetores para a Terapia Gênica

Para que a terapia gênica funcione, juntamente com a molécula de DNA recombinante, faz-se necessária a utilização de um veículo capaz de carrear o material extracromossomal até a região alvo com eficiência e entregar o material de maneira eficaz a fim de garantir a execução do tratamento (TEBAS et al, 2014; NARDI; TEIXEIRA; SILVA. 2002).

Para atingir esse objetivo, a terapia genética requer tecnologias eficientes e capazes de transferir genes para uma ampla variedade de células, tecidos e órgãos. Uma das grandes barreiras enfrentadas para o sucesso da aplicação destes tratamentos é o desenvolvimento de vetores seguros e eficazes para transportar material genético para uma célula (VERMA; WEITZMAN, 2005).

Vetor é o nome dado para o veículo utilizado para a entrega do gene. O vetor deve ser capaz de fornecer os genes do tamanho necessário para aplicação clínica e não ser imunogênico. Existem vários tipos de vetores usados em diferentes métodos, com a finalidade de entregarem o gene as células alvo com maior eficiência (MISRA, 2013; KHAN et al., 2016; FÉCCHIO; MACEDO; RICCI, 2018).

Como a terapia gênica visa a inserção de genes exógenos ao genoma humano, estes vetores enfrentarão os mecanismos de defesa do organismo, e terão que escapar dos mecanismos imunológicos de destruição, facilitando assim a entrada do material genético pela bicamada lipídica celular. Atualmente, são de grande importância vetores plasmidiais e virais (LINDEN, 2010; GONÇALVES; PAIVA, 2017).

Um vetor ideal para a inserção de genes exógenos é aquele que apresenta algumas destas características: 1) apresenta produção reproduzível e fácil; 2) não é dispendioso; 3) capaz de atingir o tipo celular que esteja mais ligado a determinada doença; 4) não ocasionar nenhum efeito patológico através da transferência do vetor (VERMA; WEITZMAN, 2005).

4.1.1.1. **Plasmidiais**

Bactérias são organismos simples, procarióticos, que possuem um ou mais cromossomos principais e podem apresentar plasmídeos. Os plasmídeos são moléculas de DNA circulares ou lineares, presentes em muitas classes de bactérias. Os plasmídeos se replicam juntamente com a bactéria seja a divisão por fissão binária ou de forma independente dentro da bactéria. Os plasmídeos apresentam grande importância para bactéria podendo lhes garantir vantagens acerca do crescimento, possibilitar a obtenção de resistência a antibióticos, favorecer a sobrevivência em condições ambientais diversas e a propagação do DNA plasmidial a diversas estirpes e outras bactérias, através dos processos de transdução e de conjugação (ARAUJO; ALVES; BECHTLUFFT, 2009)

Os vetores plasmidiais constituem uma das formas capazes de entregar o gene de interesse terapêutico. É uma molécula de DNA circular, que contém as sequências regulatórias promotores e intensificadores (VOSS. 2007; GILL; PRINGLE; HYDE, 2009).

Ainda existe a necessidade de vencer a barreira física exercida pela membrana das células, o que acarreta na diminuição da eficiência da entrega do gene terapêutico à região alvo de inserção do material genético (GILL; PRINGLE; HYDE, 2009; LINDEN, 2010).

O desenvolvimento de métodos que fossem capazes de otimizar a entrega do material genético era necessário para implementar a terapia gênica por meio de vetores plasmidiais. Era necessário fragilizar a membrana celular para que aumentasse a eficiência da entrega do gene (LINDEN, 2010; MISRA 2013).

4.1.1.1.1. **Microinjeção**

Uma metodologia para introdução do DNA plasmídial de forma direta, ou seja, inserir diretamente o material genético no núcleo da célula, aumentando assim a sua eficiência na entrega do gene terapêutico é a microinjeção (MISRA, 2013). Os ensaios pré-clínicos utilizando o DNA plasmídial obtiveram sucesso ao transferir o gene diretamente para células musculares de camundongos usando essa técnica (WOLFF et al., 1990).

Esta metodologia não é muito usada, em função de apresentar algumas desvantagens: 1) o número de células que conseguem ser alteradas é estritamente limitado e 2) a aplicação limita-se aos tecidos com baixa concentração de endonucleases, como os tecidos musculares. Pela introdução direta a células, o risco de lise celular é demasiadamente aumentado no momento da microinjeção. (DANI; 2000; NARDI, TEIXEIRA; SILVA, 2002).

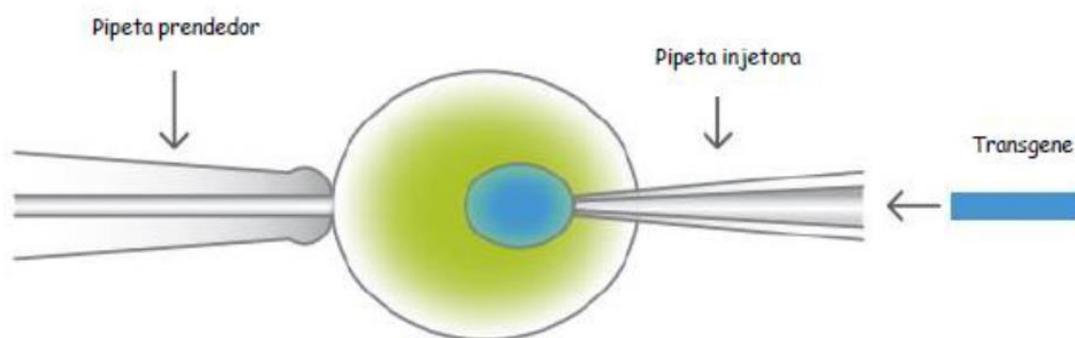


Figura 2: Esquema do processo de transfecção do transgene por microinjeção
Fonte: Adaptado de Transfection methods overview - BioRad

4.1.1.1.2. **Eletroporação**

A eletroporação utiliza pulsos elétricos para permeabilizar transitoriamente a membrana celular. A exposição de células vivas a pulsos elétricos induz alterações

dependentes da diferença de potencial transmembrana. Quando o valor da diferença de potencial transmembrana é maior que 0,2 a 0,4 V, haverá a formação de estruturas de permeação transitória na membrana celular. A eletroporabilidade é, portanto, um fenômeno imposto pela necessidade de ultrapassar um valor limiar da diferença de potencial transmembrana (MIR et al., 2005).

Nesta metodologia de inserção de material genético na célula alvo, há a indução de pulsos elétricos em células que estão presentes em uma solução que contém DNA plasmidial. Através dessa indução elétrica após ultrapassar o potencial transmembrana haverá fragilização da membrana e formação de eletroporos que irão facilitar a passagem do material genético para as células. Com a retirada do campo elétrico haverá fechamento dos eletroporos formados, conforme exemplificado na figura 3 (NARDI; TEIXEIRA; SILVA, 2002; LINDEN, 2010).

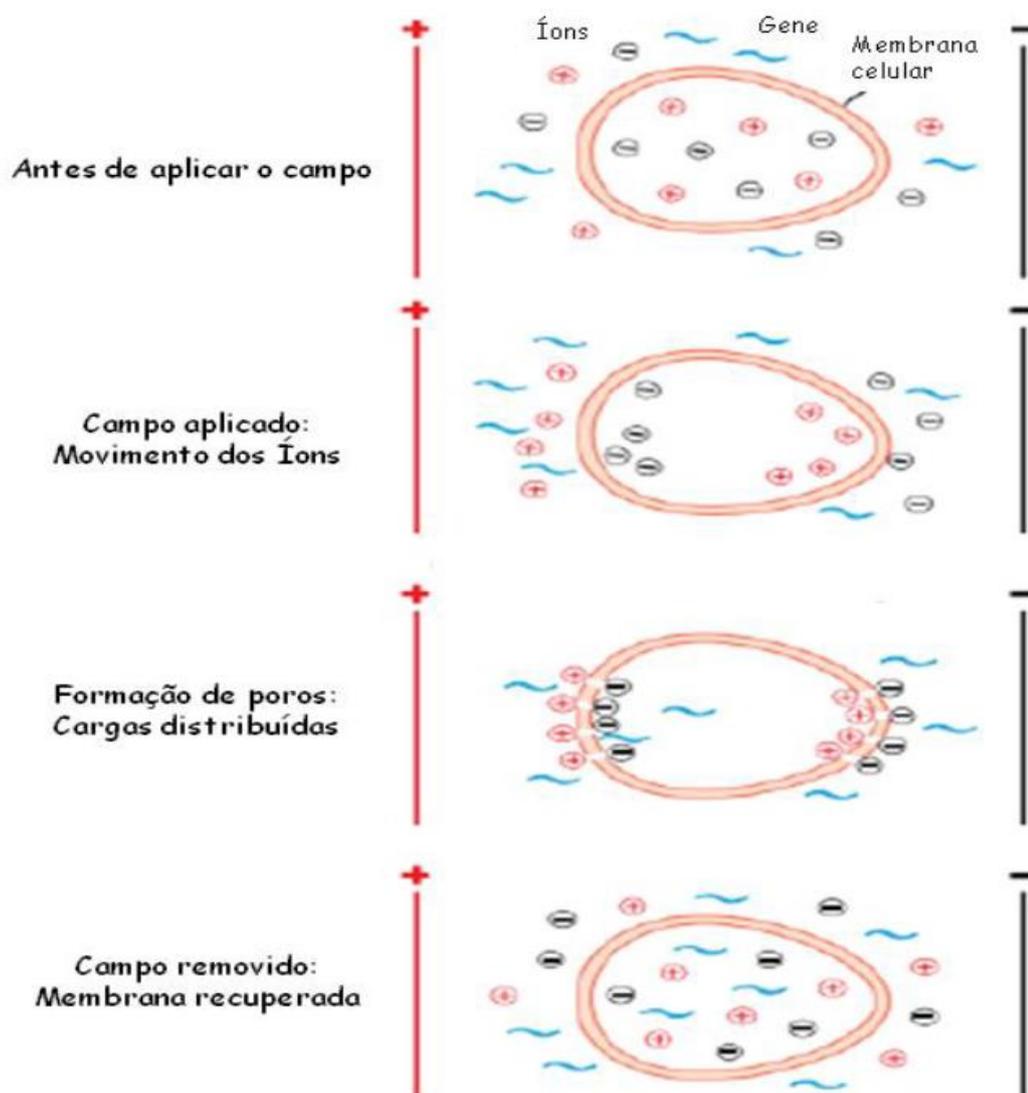


Figura 3: Esquema do processo mediado por eletroporação
Fonte: Adaptado de Transfection methods overview – BioRad

Como desvantagem da técnica de eletroporação há efeitos vasculares que surgem não apenas na região de aplicação dos eletrodos, mas aparecendo distalmente a área de aplicação. Os efeitos envolvem a vasoconstrição reflexa das arteríolas eferentes e a permeabilização permanente das células afetadas. Entretanto, não afetam a transferência gênica e os efeitos adversos vasculares observados da eletroporação são mínimos (GEHL; SKOVSGAARD; MIR, 2002; MIR et al., 2005).

As vacinas de DNA são um exemplo de uso das metodologias de microinjeção e da eletroporação que usufruem da tecnologia de DNA recombinante juntamente com vetores plasmidiais para exercerem uma resposta imune específica a proteína antigênica introduzida no organismo (MENK; VENTURA, 2007). As vacinas de DNA são compostas de um gene que codifica um antígeno, cuja expressão é regulada por um promotor forte expresso em uma estrutura do plasmídeo bacteriano (KLINMAN et al., 2010). Ao ser injetado em um tecido, a parte eucariótica desse plasmídeo expressa a proteína antigênica e irá gerar resposta imune que tem como objetivo a proteção contra futuras infecções (MENK; VENTURA, 2007).

4.1.1.1.3. **Biobalística**

Também chamada de bombardeamento de partículas, este método de inserção de DNA baseia-se na entrega direta do material genético de interesse às células utilizando partículas de ouro ou tungstênio (BALTES; GIL-HUMANES; VOYTAS, 2017). As partículas utilizadas nessa metodologia são revestidas com o material genético de interesse que se deseja inserir dentro da célula alvo. Logo, as partículas são disparadas contra o tecido do organismo com o auxílio de um equipamento chamado de arma de gene (*gene gun*). Então, as partículas são lançadas a uma alta velocidade podendo ficar alojadas dentro de células. A partir desse ponto, o DNA de interesse terapêutico poderá ser transitoriamente expresso ou se integrar ao genoma do organismo hospedeiro, contornando a dificuldade enfrentada pelos vetores plasmidiais para adentrar a membrana celular (NARDI; TEIXEIRA; SILVA, 2002; BALTES; GIL-HUMANES; VOYTAS, 2017).

Este método de inserção de material genético às células alvo apresenta algumas desvantagens como o baixo rendimento, a incapacidade de controlar o alvo celular a ser bombardeado pelas partículas e a alta lise celular gerada (BALTES; GIL-HUMANES; VOYTAS, 2017).



Figura 4: Esquema do processo de transformação mediado por biobalística

Fonte: Transfection methods overview - BioRad

4.1.1.2. Vetores Virais

Os vírus se apresentam como vetores eficazes para internalização celular e escapar dos mecanismos de defesa do organismo, conseguindo assim inserir seu material genético na célula alvo. Logo, alguns vírus foram modificados com a finalidade de serem usados como vetores para transporte de DNA. Bacteriófagos, retrovírus, adenovírus, e vírus adeno-associados (AAV) são exemplos de alguns dos vírus utilizados na atualidade (DANI, 2000).

A idéia central da utilização dos vírus como vetores é por causa da capacidade inata em entregar o material genético viral à célula infectada (VERMA; WEITZMAN, 2005). Os sistemas virais utilizados apresentam vírus que são deficientes em replicação, mas que ainda são capazes de transferir seu material genético, não conseguindo continuar seu ciclo infeccioso no organismo hospedeiro, evitando assim os efeitos deletérios (ROMANO et al, 2000).

O princípio da produção de vetores virais para terapia gênica consiste em remover os genes responsáveis pela patogenicidade e proliferação viral, permanecendo apenas o necessário para a invasão, seguida da inserção de um gene terapêutico, deixando assim o uso destes vetores mais seguros para aplicação em humanos (DANI, 2000; NARDI; TEIXEIRA; SILVA, 2002; VERMA; WEITZMAN, 2005).

De acordo com a figura 5, é crucial a identificação das sequências do genoma viral que correspondem a replicação, a construção de partículas virais, ao empacotamento do material genético viral e a patogenicidade. Em seguida, a construção da estrutura de encapsulamento deve conter apenas os genes que codificam as proteínas estruturais, eliminando assim os genes desnecessários que não estão envolvidos nestas funções ou que estejam envolvidos em patogenicidade. A construção do vetor contém as sequências essenciais reguladoras como a origem de replicação, o sinal de empacotamento e o transgene de interesse (VERMA; WEITZMAN, 2005). Como o “DNA nu” não consegue atravessar a membrana das células e estimula o organismo a gerar uma resposta imune (GILL;

PRINGLE; HYDE, 2009), é necessário reconstruir o vírus para facilitar a entrada na célula e evadir os mecanismos de defesa do sistema imunológico. Então, as sequências que correspondem a construção do vetor e a do empacotamento serão inseridas em células produtoras, seja por transfecção, pela infecção por vírus auxiliares, ou através da fragilização da membrana por eletroporação. A partir disto as proteínas necessárias para a replicação viral e sua montagem serão expressas vindas da sequência da estrutura de empacotamento. A formação do vetor viral recombinante se dará através do encapsulamento do genoma do vetor em partículas virais, sendo necessário uma posterior purificação a fim de obter apenas o vetor viral recombinante purificado (VERMA; WEITZMAN, 2005; LINDEN, 2010).

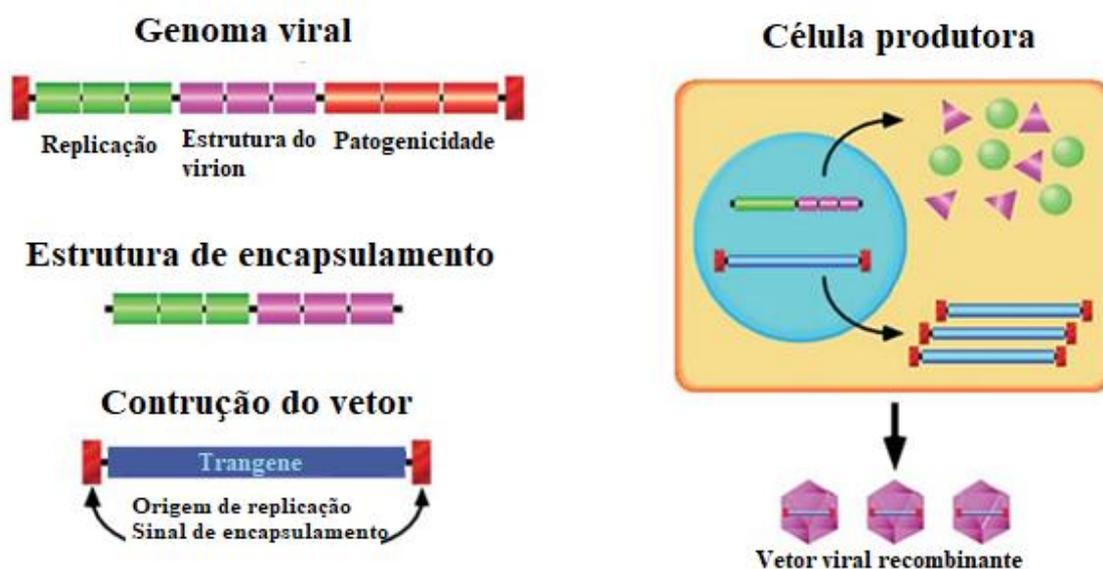


Figura 5: Princípio da geração de um vetor viral
Fonte: Adaptado de VERMA; WEITZMAN, 2005

Existe um amplo espectro de vírus que podem ser utilizados como vetores para a terapia gênica, nos quais há diferenças e semelhanças entre os mais usados. Exemplificando, os tipos de genomas virais podem ser de fita simples (do inglês, single strand, ss) ou fita dupla (do inglês, double strand, ds), podendo ser tanto de RNA quanto de DNA (VERMA; WEITZMAN, 2005; LUNDSTROM, 2018). A tabela 2 mostra a compilação dos exemplos de vetores virais aplicados a terapia gênica associando os vírus com suas respectivas características.

Tabela 2: exemplos de vetores virais aplicados para terapia gênica.

Vírus	Genoma	Capacidade de inserção	Características
adenovírus	dsDNA	< 7,5kb	Expressão transitória, forte imunogenicidade, ampla gama de hospedeiros
AAV	ssDNA	< 4 kb	Resposta imune, início de expressão lenta, integração cromossômica, gama de hospedeiros relativamente alta.
Vírus Herpes simplex	dsDNA	> 30 kb	Ampla gama de hospedeiros, infecção latente, expressão a longo prazo, baixa toxicidade, grande capacidade de inserção.
Retrovírus	ssRNA	8 kb	Transduz apenas células em divisão, expressão de longo prazo, integração aleatória.
Lentivírus	ssRNA	8 kb	Ampla gama de hospedeiros, baixa citotoxicidade, integração, expressão de longo prazo
Alphavírus	ssDNA	8 kb	Ampla gama de hospedeiros, expressão transitória extrema, baixa imunogenicidade.
Flavivírus	ssDNA	6 kb	Gama de hospedeiros relativamente ampla, expressão transitória, sistema de encapsulamento
Rabdivírus	ssDNA	6 kb	Gama de hospedeiros relativamente ampla, baixa imunogenicidade, alta expressão transitória
Vírus do sarampo	ssDNA	6 kb	Expressão transitória, cepas oncolíticas
Vírus da doença de Newcastle	ssDNA	6 kb	Replicação em células tumorais, vírus melhorou vetores oncolíticos
Poxvíruses	dsDNA	> 30 kb	Ampla gama de hospedeiros, grande capacidade de inserção, vetores competentes para replicação
Picornavírus	ssDNA	6 kb	Cepas oncolíticas

Fonte: Modificado de LUNDSTROM, 2018

4.1.1.2.1. **Retrovírus**

Os retrovírus são vírus que apresentam seu material genético constituído por RNA, com seu genoma composto por ssRNA com cerca de 7 a 11 kb. Seu envelope é composto de lipídios e após se internalizarem nas células conseguem criar fitas duplas de DNA a partir de uma retrotranscrição utilizando uma enzima chamada de transcriptase reversa (KAY;

GLORIOSO; NALDINI, 2001). Possuindo três genes cruciais no seu RNA, os genes *gag*, *pol* e *env* impactam diretamente no ciclo de vida viral e o conhecimento de suas funções é de grande importância para a construção de um vetor retroviral. Sendo assim, o gene *pol* é o responsável por conter as sequências necessárias para codificar as enzimas virais protease, transcriptase reversa e integrase. O gene *gag* codifica as proteínas do núcleo capsídeo, que são geradas por clivagem proteolítica da proteína precursora *gag*. O gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope viral, que irão atuar na entrada do vírus. Os oncoretrovírus se apresentam como vírus mais simples por apresentarem apenas os genes estruturais *gag*, *pol* e *env*, enquanto que os lentivírus têm uma forma mais complexa (VERMA; WEITZMAN, 2005).

A utilização dos retrovírus como vetores para terapia gênica foi marcada na história com um sucesso no tratamento da imunodeficiência severa combinada ligada ao cromossomo X (SCID-X1). O ensaio utilizou vetores lentivirais para implantação de células autólogas da medula óssea nos pacientes, levando a uma boa reconstituição do sistema imunológico na maioria dos pacientes tratados (GASPAR; THRASHER, 2005; LUNDSTROM, 2018). Esta doença é originada por uma mutação no gene *IL2RG*. Os portadores da SCID apresentam desenvolvimento deficiente de células natural killers e linfócitos T, além de se observar que os linfócitos B não são funcionais (NIENHUIS, 2013; MUKHERJEE; THRASHER, 2013).

Um dos grandes problemas para utilização dos retrovírus como vetores é a não especificidade de integração no genoma do hospedeiro, no qual a enzima integrase faz a inserção do transgene em qualquer posição do genoma, possibilitando assim a mutagênese por inserção ou pelo descontrole da divisão celular (KAY; GLORIOSO; NALDINI, 2001; VERMA; WEITZMAN, 2005; COURA, 2012; MISRA, 2013). Os lentivírus, como o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1), mostram-se mais seguros na ativação de proto-oncogenes quando comparados com outros retrovírus (VERMA; WEITZMAN, 2005; COURA, 2012). Estudos mostraram que os vetores lentivirais têm uma menor tendência a se integrarem ao genoma do hospedeiro em locais que potencialmente podem causar câncer (COURA, 2012).

O HIV se destaca quando se refere à construção de vetores retrovirais. Os vetores baseados em HIV-1 foram desenvolvidos com a finalidade de se atingir células que não fazem divisão celular, sendo eficientes tanto na metodologia *in vivo* quanto na *ex vivo*. Entretanto, apresentam potencial de gerar patogenicidade residual o que induz a buscar

novos tipos de vetores a fim de evitar efeitos deletérios da terapia utilizando-se o HIV-1 como vetor (KAY; GLORIOSO; NALDINI, 2001; VERMA; WEITZMAN, 2005; NIENHUIS, 2013). Existem preocupações quanto à biossegurança para a administração desses vírus como vetores. O vetor lentiviral do HIV-1 foi depletado de todas as proteínas acessórias e as suas sequências virais foram minimizadas visando ter uma replicação viral fortemente debilitada. (VERMA; WEITZMAN, 2005)

4.1.1.2.2. **Adenovírus**

Os adenovírus são vírus de DNA com seu genoma composto por uma única e linear ds-DNA, possuem forma icosaédrica e sua replicação acontece exclusivamente dentro de células infectadas sem integrar o genoma viral ao genoma do hospedeiro, apenas ficando com o DNA viral livre no núcleo da célula. As proteínas virais serão produzidas normalmente e em sequência ocorrerá a lise celular quando os virions maduros são liberados. A família dos adenovírus possui mais de 50 sorotipos diferentes, que conseguem infectar vários tecidos celulares (VORBURGER, 2002; VERMA; WEITZMAN, 2005; COURA, 2012; CHIRA et al., 2015).

Os genes adenovirais dividem-se em grupos: 1) os genes de fase precoce, sendo os genes E1A, E1B, E2, E3 e E4 e 2) genes de fase tardia, sendo IX e IVa2 (VERMA; WEITZMAN, 2005). Durante seu processo de replicação, os genes da região precoce 1 (E1) são transcritos e são usados como reguladores transcricionais para o processo de replicação do genoma. Os genes E1 (E1A e E1B), em combinação com os genes E2 e E4, são utilizados para a replicação de todo material genético viral. O gene E3 é um gene sem função essencial para o vírus (KAY; GLORIOSO; NALDINI, 2001; VORBURGER, 2002; VERMA; WEITZMAN, 2005).

Como a replicação dos adenovírus depende da região E1A do genoma viral, então todos os vetores feitos com adenovírus recombinantes possuem esta região do seu genoma depletada com a finalidade de criar vírus que não se replicam (VERMA; WEITZMAN, 2005; COURA, 2012).

Os adenovírus são propensos a serem atacados pelo sistema imunológico, gerando uma forte resposta imunológica. Os altos níveis de vírus necessários para o tratamento geralmente provocam uma resposta inflamatória indesejável. Mesmo com desvantagens, este sistema de vetores vem sendo usado como tratamento de câncer de fígado e ovários. O

primeiro produto da terapia gênica a ser licenciado para tratar câncer de cabeça e pescoço é o Gendicine, produto adenoviral baseado em p53 (VORBURGER, 2002; VERMA; WEITZMAN, 2005; NIENHUIS, 2013; LUNDSTROM, 2018).

4.1.1.2.3. **Vírus Adenoassociados**

Os vírus adenoassociados (AAV) são vírus pertencentes a família Parvoviridae e eles podem ser caracterizados por seu genoma linear ssDNA, encapsulados em um capsídeo viral icosaédrico, não sendo patogênicos (VERMA; WEITZMAN, 2005; COURA, 2012). O genoma viral possui apenas dois genes que influenciam na criação de vetores, os genes *Rep* e *Cap* (CHIRA et al., 2015).

A infecção por AAV necessita de algumas funções auxiliares que podem ser ajustadas por uma co-infecção com vírus auxiliares, como adenovírus e herpes vírus. AAV também podem se replicar em células que foram colocadas sob estresse, como irradiação ou tratamento com agentes genotóxicos. Na ausência de um meio permissivo que ampare o vírus para a sua replicação, o DNA viral pode se integrar ao genoma do organismo hospedeiro e estabelece assim uma infecção latente (VERMA; WEITZMAN, 2005; CHIRA et al., 2015).

A principal desvantagem do AAV é ser um vírus muito pequeno, tendo apenas dois genes (VERMA; WEITZMAN, 2005, COURA, 2012, CHIRA et al., 2015). Os vetores baseados em AAV tem a finalidade de ter uma integração ao genoma do organismo hospedeiro. Comparando com outros vetores virais, os vetores de AAV possuem algumas vantagens que incluem a ausência ou baixa resposta imunológica e a capacidade de infectar vários tipos de células (KAY; GLORIOSO; NALDINI, 2001; VERMA; WEITZMAN, 2005; COURA, 2012; CHIRA et al., 2015).

Existem relatos de eficácia pré-clínica em alguns modelos animais para as doenças genéticas e para as adquiridas. Alguns ensaios clínicos usando AAV para o tratamento da fibrose cística, hemofilia e distrofia muscular demonstraram alguma evidência de transferência gênica e expressão do fator IX de coagulação humana em pacientes com hemofilia B (KAY et al., 2000; LUNDSTROM, 2018).

4.1.1.2.4. **Vírus da Herpes Humana**

O vírus da herpes humana (HHV) pertence a família Herpesviridae. São vírus que possuem genoma com dsDNA, com seu núcleo contendo um capsídeo icosaédrico envolto por proteínas não estruturais de matriz, que são chamadas de tegumento. Seu envelope é composto por uma bicamada lipídica com glicoproteínas ramificadas (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014). Estes vírus são considerados onipresentes neurotrópicos e neuroinvasivos, que persistem no corpo tornando-se latentes ou desativados, escapando assim da resposta imunológica do organismo hospedeiro. Apresentam vários genes em seu genoma e muitos destes genes não são essenciais, o que os tornam excelentes candidatos a vetores para a terapia gênica (VERMA; WEITZMAN, 2005; COURA, 2012; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014).

O vírus da herpes simples tipo 1 (HSV-1) é o vírus que mais incita desenvolvimento como vetor para terapia gênica, sendo o vírus mais extensamente modificado para seu uso. O HSV possui um grande genoma com cerca de 84 genes, sendo que metade destes genes não essenciais para replicação viral podendo assim ser descartados (VERMA; WEITZMAN, 2005; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014). Logo, o HSV apresenta grande capacidade de inserção podendo inserir grandes genes simples ou múltiplos transgenes.

Existem quatro proteínas do envelope viral que comandam a interação do vírus e a sua entrada na célula. As proteínas *gB* e *gC* ligam-se ao sulfato de heparano na superfície celular, e isto é seguido pela ligação de *gD* aos receptores celulares conhecidos como mediadores de entrada de herpesvírus HVEM / HveA e HveC / nectina-1. Durante o ciclo de replicação, a síntese proteica da célula hospedeira é interrompida após infecção pela proteína vhs tegumentar. A expressão proteica ocorre de uma forma altamente regulada e pode ser dividida em três grupos de proteínas expressas sequencialmente: α - ou genes imediatos precoces, β ou genes precoces e γ ou genes tardios. Sendo assim, a partir do momento em que o há a formação dos produtos do gene β , a replicação do DNA viral e a produção do gene γ são iniciadas. No núcleo, as proteínas da capsídeo se juntam com os genomas do DNA viral, e as capsídeos virais recém-formados brotam através da membrana nuclear (KAY; GLORIOSO; NALDINI, 2001; VARGHESE; RABKIN, 2002; VERMA; WEITZMAN, 2005).

Foi observado a transferência de DNA utilizando o HSV como vetor, em vários tipos de células. Estes vetores vêm sendo usados em várias estratégias da terapia gênica, incluindo

doenças neurológicas, lesão do nervo espinhal, glioblastoma e até terapia da dor (BURTON; FINK; GLORIOSO, 2002).

As principais limitações para a utilização do HSV como vetor para a terapia gênica são a forte resposta imunológica desencadeada pela expressão genética viral e a lise celular causada pelo ciclo de vida do vírus (VERMA; WEITZMAN, 2005; COURA, 2012).

4.1.2. Edição Genômica

Atualmente, um grande desafio enfrentado pelos pesquisadores é como revelar o mecanismo molecular dos genes que influenciam na manifestação de doenças, bem como fazer uma associação entre fenótipo observado no organismo a um gene específico ou múltiplos genes. A falta de informação total ou parcial acerca das funções dos genes do genoma humano, bem como a influência de fatores externos aos fenótipos observados, criam uma grande barreira para o desenvolvimento de métodos capazes de alterar o genoma humano. Uma forma eficaz para contornar este problema é tentar elucidar a função de um gene, silenciá-lo ou superexpressá-lo em organismos vivos (GUPTA; MUSUNURU, 2014; ZHANG; WEN; GUO, 2014).

Com o passar dos anos e com o rápido avanço tecnológico foram descobertos segundo o site www.omim.org/statistics/geneMap (2019) aproximadamente 4100 genes com mutação que levam a algum fenótipo e cerca de 6400 fenótipos que já se sabe a base molecular.

A edição do genoma vem suprir a necessidade de alterar o genoma humano com a finalidade de curar ou melhorar o prognóstico de doenças. A capacidade de introduzir genes com precisão e com eficiência incita pesquisadores a desenvolverem cada vez mais métodos e protocolos clínicos com base neste tema (GUPTA; MUSUNURU, 2014). Segundo Zhang, Wen, Guo (2014) “a edição precisa do genoma tem o potencial de curar doenças através da destruição de genes endógenos causadores de doenças, corrigindo mutações causadoras de doenças ou inserindo novos genes protetores”.

As técnicas de edição genômica iniciam uma quebra da fita dupla de DNA (do inglês Double strand breaks, DSBs) em sítios específicos, sendo esta uma etapa crucial para o sucesso das técnicas (COX; PLATT; ZHANG, 2015). Através da lesão provocada à fita de DNA, o sistema de reparo é ativado e pode ocorrer através de dois mecanismos, sendo eles:

o reparo direto homólogo (do inglês Homologous direct repair, HDR) e a união das extremidades não homólogas (do inglês non-homologous end-joining, NHEJ) (GUPTA; MUSUNURU, 2014; SANDER; JOUNG, 2014; COX; PLATT; ZHANG, 2015).

O método de reparo por HDR necessita de uma fita guia de DNA homólogo à região da lesão, para servir como molde e assim efetuar o reparo da DSB realizada. Então, a HDR pode ser usada para restaurar as funções de genes que sofreram mutação, obtendo assim a sua expressão normal (COX; PLATT; ZHANG, 2015).

O método por NHEJ irá reparar as lesões causadas pelas DSBs pela junção das extremidades quebradas do DNA alvo, não necessitando de uma fita molde como na HDR. Desta forma, erros são muito propensos a ocorrer visto que, mutações por inserção ou deleções (indels), são observadas no local da quebra da fita de DNA (LIEBER et al., 2003; COX; PLATT; ZHANG, 2015).

Conforme demonstrado na figura 6, (A) o reparo por NHEJ pode condicionar à inserção ou deleção (indels) de uma sequência de genes, o que pode favorecer a formação de códons de parada, promovendo o nocaute de tais genes. Isso leva à produção de proteínas truncadas e a formação de elementos nonsense. (B) A indução de duas DSBs pode levar a deleção da região gênica que sofreu algum tipo de mutação por NHEJ, de modo a reparar proteínas mutadas. (C) Transgenes podem ser inseridos por NHEJ uma vez que tenham pontos de reconhecimento para as regiões onde ocorreram as DSBs. (D) A HDR também pode levar à adição de genes em locais alvo específicos. É necessária uma fita molde de DNA que tenha o gene de interesse de expressão para ocorrer essa inserção, levando a produção de novas proteínas a partir do RNA mensageiro produzido por essa região gênica. (E) A HDR possibilita a correção de sequências mutadas (SANDER; JOUNG, 2014; COX; PLATT; ZHANG, 2015).

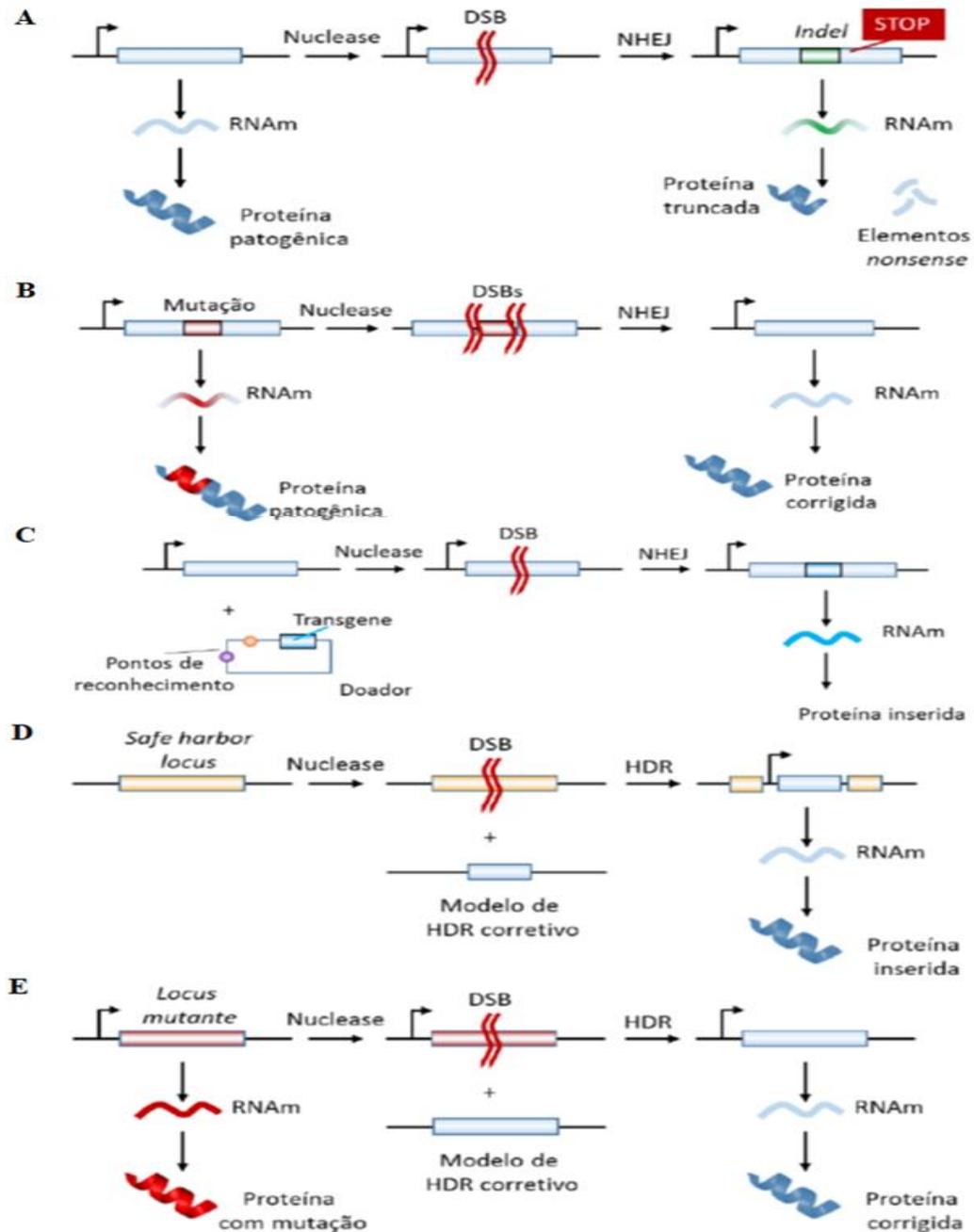


Figura 6: Mecanismos de reparo celular mediado por HDR e NHEJ
Fonte: Modificado de COX; PLATT; ZHANG, 2015

A edição do genoma mostra-se como uma alternativa promissora para alterar sequências genéticas mutadas e tratar distúrbios e doenças genéticas (COX; PLATT; ZHANG, 2015). Os principais métodos para a edição do genoma serão brevemente falados, sendo eles as nucleases dedos de zinco (do inglês, zinc fingers nucleases, ZFN), transcrição de nucleases efetoras ativadoras transcricionais (do inglês, transcription activator-like effector nucleases, TALENs) e a técnica de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (do inglês, clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR). Todas estas tecnologias para edição de genoma fazem uso das

descobertas da tecnologia do DNA recombinante. Assim, todas as três tecnologias utilizam enzimas de restrição sítios específicos para gerarem uma DSB específica. Estes métodos dependem do funcionamento normal do organismo para serem bem-sucedidos, pois dependem dos mecanismos de HDR e NHEJ. Os mecanismos de reparo celular são estimulados pelas tecnologias de edição do genoma citados acima através da geração de DSBs específicas (LIEBER et al, 2003; GUPTA; MUSUNURU, 2014; SANDER; JOUNG, 2014; COX; PLATT; ZHANG, 2015). Através do conhecimento da função dos genes e sua associação com a doença, estratégias terapêuticas baseando-se nestas metodologias foram sendo desenvolvidas (Tabela 3; COX; PLATT; ZHANG, 2015).

Tabela 3: Exemplos de aplicações da edição do genoma para modelos de terapias

Tipo de doença	Nuclease	Estratégia terapêutica
Hemofilia B	ZFN	Inserção da sequência correta do gene mediada por HDR
HIV	ZFN CRISPR	Inativação mediada por NHEJ de CCR5
Distrofia muscular de Duchenne	CRISPR TALEN	Remoção do códon de parada mediada por NHEJ e correção do gene mediado por HDR
Vírus da hepatite B	CRISPR TALEN	Depleção do DNA viral mediada por NHEJ
SCID	ZFN	Inserção da sequência correta gene mediada por HDR
Catarata	CRISPR	Correção da mutação mediada por HDR no zigoto de camundongo
Fibrose cística	CRISPR	Correção mediada por HDR em células tronco intestinais
Tirosinemia hereditária	CRISPR	Correção da mutação mediada por HDR no fígado

Fonte: modificado de COX; PLATT; ZHANG, 2015.

4.1.2.1. ZFN

Os dedos de zinco (do inglês Zinc fingers, ZFs) constituem pequenos domínios proteicos em que o zinco contribui para a estabilidade térmica e conformacional da estrutura da proteína. Os ZFs estão presentes em inúmeras proteínas que reconhecem sequências de DNA ou de RNA, e que atuam como fatores de transcrição, replicação, proliferação celular e apoptose (KRISHNA, 2003; KLUG, 2010).

As nucleases dedo de zinco (do inglês, Zinc finger nucleases, ZFNs) são sistemas capazes de editar o genoma, utilizando proteínas quiméricas de fusão que compreendem

locais específicos nos domínios de ligação de DNA, que são direcionados para ZFs, fundindo com o domínio da endonuclease de restrição da enzima FokI (KLUG, 2010; CARROLL, 2011; GUPTA; MUSUNURU, 2014).

Para gerar uma quebra específica na fita de DNA, as ZFNs são desenhadas em pares para reconhecerem as sequências que cercam o local alvo para gerar uma DSB, sendo estes pares localizados uma na fita dianteira e a outra na fita reversa. Deve ocorrer dimerização dos domínios FokI das ZFNs para gerarem a DSB no local específico. Os mecanismos de reparo celular serão ativados, por HDR, ou por NHEJ. Logo, os mecanismos de reparo celular por NHEJ podem gerar erros causando mutações e/ou proteínas não funcionais. O mecanismo por reparo HDR necessita de um molde guia para realizar o reparo, este molde pode ser obtido durante a fase S ou fase G2 da divisão celular, quando uma cromátide irmã está disponível para servir como molde (CARROLL, 2011; GUPTA; MUSUNURU, 2014).

Resultados de reparo de DSB são ilustrados na figura 7 para o caso de clivagem de ZFN. Um par de ZFNs de três dedos é exemplificado na parte de cima juntamente com um gene alvo. Se um DNA molde homólogo for fornecido, o reparo pode prosseguir por recombinação homóloga usando o modelo de DNA como guia. Caso não haja molde disponível, o reparo poderá ocorrer por NHEJ, simplesmente unindo os fragmentos gerados pela DSB (CARROLL, 2011).

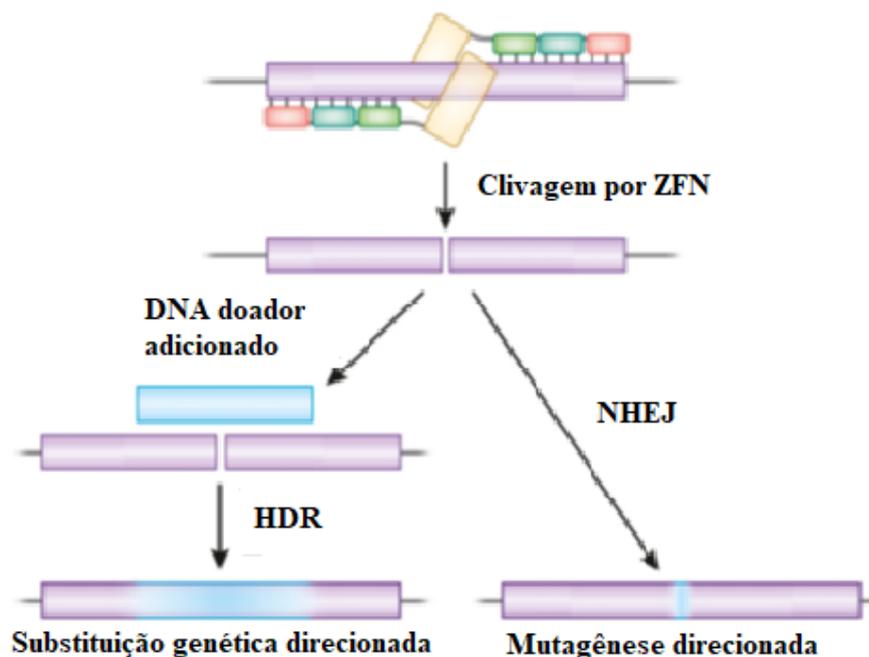


Figura 7: Exemplo de clivagem pelas ZFN
Fonte: CARROLL, 2011

As ZFNs são ferramentas promissoras para tratar algumas doenças. Um exemplo disto são os estudos sobre o seu uso para o tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). O vírus do HIV necessita de um receptor de quimiocina CCR5 para adentrar a célula com mais facilidade. Foi demonstrado que pacientes com mutações naturais no gene *CCR5* tem uma resistência ao vírus. A vantagem potencial de uma abordagem ZFN é um silenciamento genético totalmente penetrante e hereditário, que persiste durante toda a vida da célula e sua progênie (URNOV et al., 2010; KHALILI et al., 2015). Alguns estudos sobre o uso da ZFN para o tratamento da SCID-X1 foram desenvolvidos. Foi observado uma correção pontual da mutação em 18% das células, confirmando que ocorreu HDR com um plasmídeo dador (LAFONTAINE; FATHE; SMYTH, 2015).

A desvantagem acerca dessa técnica envolve a sua complexidade. Pode ocorrer também toxicidade e quebras de DNA em locais não desejados (GUPTA; MUSUNURU, 2014).

4.1.2.2. **TALEN**

As nucleases com efetores ativadores transcricionais (do inglês, transcription activator-like effector nucleases (TALENs) surgiram depois da criação da tecnologia de ZFN. Surgiu como uma alternativa para editar o genoma humano, e que também faz uso dos mecanismos de reparo celular HDR e NHEJ para corrigir algum erro em determinada região do DNA, ou cessar a expressão de um gene (SUN; ZHAO, 2013; GUPTA; MUSUNURU, 2014; HOTTA; YAMANAKA, 2015).

As TALENs, assim como as ZFN, também fazem uso do domínio da endonuclease de restrição da enzima FokI, porém, diferentemente das ZFNs, o domínio de ligação de DNA (do inglês, domain bind DNA, DBD) das TALENs são compostos de uma série de repetições, que são similares a classe de proteínas chamadas de efetores do tipo ativador de transcrição (do inglês, transcription activator-like effectors, TALE), que foram descobertas em um grupo de bactérias (BOGDANOVE; VOYTAS, 2011; SUN; ZHAO, 2013; GUPTA; MUSUNURU, 2014). Cada repetição possui dois aminoácidos adjacentes que são denominados de repetições de di-resíduo variável (do inglês, variable di-residue, RVD), que conferem especificidade para um dos quatro pares de bases de DNA. A especificidade de ligação ao DNA de um TALE é determinada pelo seu número de repetições e a sequência do RVD na qual o número de repetições determina o comprimento da sequência alvo, e o

código RVD corresponde diretamente ao nucleotídeo no local de destino (CHEN; GAO, 2013; GUPTA; MUSUNURU, 2014)

A tecnologia das TALENs efetivam o reconhecimento da sequência do DNA alvo através dos RVD e posteriormente geram uma DSB no local através do domínio da enzima *fokI* (MOSCOU; BOGDANOVE, 2009; BOGDANOVE; VOYTAS, 2011; CHEN; GAO, 2013; SUN; ZHAO, 2013; GUPTA; MUSUNURU, 2014).

Como mostrado na figura 8, deve ocorrer dimerização dos domínios *fokI* para gerar a DSB no local alvo assim como pela técnica de ZFN, porém, os domínios de ligação da técnica de TALEN não são construídos em pares, e podem ter comprimentos diferentes para gerarem uma DSB (GUPTA; MUSUNURU, 2014).

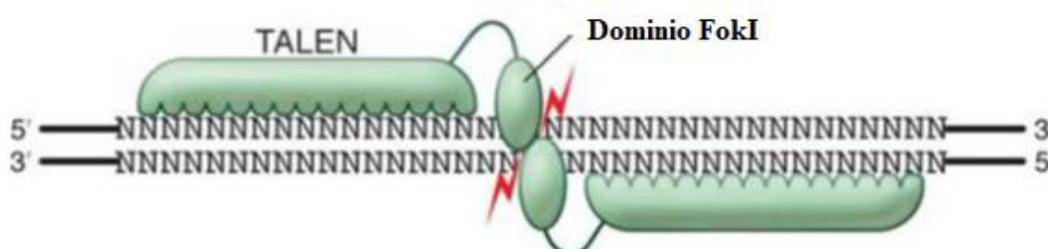


Figura 8: Mecanismo de geração de DSB por TALEN
Fonte: Adaptado de GUPTA; MUSUNURU, 2014

Fazendo uma comparação com as ZFNs, as TALENs apresentam uma menor toxicidade, produção mais fácil e maior flexibilidade devido ao seu domínio de ligação ao DNA (LAFOUNTAINÉ; FATHE; SMYTH, 2015). A matriz de repetições poder ser facilmente estendido para qualquer comprimento desejado, diferentemente das ZFNs (SUN; ZHAO, 2013; GUPTA; MUSUNURU, 2014).

4.1.2.3. CRISPR/CAS9

A técnica de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter espaçadas (do inglês *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, CRISPR) associada a Cas9 (do inglês, *CRISPR associated, CAS*) é um método que trouxe grandes promessas a atual medicina. Diferentemente da técnica de DNA recombinante associado com os vetores para a terapia gênica, que visam a transferência de um gene sadio a outro organismo como resposta a presença de genes que levam a manifestação de doenças, esta técnica visa a eliminação da região do genoma que caracteriza a enfermidade ou a correção da região através de mecanismos de reparo celular. Sendo caracterizada como uma

técnica muito precisa e promissora (LINDEN, 2010; MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2010; CONG et al., 2013).

A técnica de CRISPR/Cas9 foi proposta a partir da observação de um mecanismo de defesa contra patógenos em bactérias e archeas (MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2010; SANDER; JOUNG, 2014; LAFOUNTAINNE; FATHE; SMYTH, 2015). Logo, este mecanismo de defesa baseia-se na cópia de um segmento de DNA do patógeno para o genoma do hospedeiro, especificamente para o locus CRISPR. Este locus no genoma do hospedeiro serve como uma memória contra patógenos invasores. Em uma nova invasão, será transcrito uma cadeia de RNA CRISPR (crRNA), na qual provém da região de memória preestabelecida da invasão. Este crRNA transcrito contém parte do material genético memorizado. O crRNA reconhecerá sequências do DNA estranho e irá se ligar por pareamento de bases junto com uma CAS, gerando uma DSB no DNA do invasor inibindo assim o seu ciclo no organismo hospedeiro (SANDER; JOUNG, 2014; GORI et al., 2015; LAFOUNTAINNE; FATHE; SMYTH, 2015).

No sistema CRISPR/Cas9, o crRNA é combinado com o trans ativante crRNA (do inglês, trans-activating crRNA, tracrRNA) para formar o complexo tracrRNA-crRNA (GUPTA; MUSUNURU, 2014; SANDER; JOUNG, 2014), sendo que o crRNA é o responsável pela orientação da endonuclease Cas9 para o DNA alvo (ZHANG; WEN; GUO, 2014). O crRNA é obtido a partir da transcrição de pequenos segmentos de DNA exógenos e interligados. Logo, os crRNAs possuem uma região chamada de *protospacers*, que contém as sequências transcritas de DNA exógenos. Então, esta região do crRNA é a responsável por direcionar a CAS9 para gerar uma quebra na região complementar ao DNA alvo (SANDER; JOUNG, 2014; ZHANG; WEN; GUO, 2014; GORI et al., 2015). O tracrRNA é um componente indispensável ao sistema CRISPR/Cas9, que atua como um ativador para processar o crRNA (SANDER; JOUNG, 2014).

Foram desenvolvidas moléculas de RNA guia (RNAg) sintéticas para clivarem sequências de interesse, na qual o crRNA e parte do tracrRNA são fundidos em uma molécula de RNAg com uma ponte contendo a sequência GAAA. Este RNAg contém uma sequência com cerca de vinte nucleotídeos, sendo capaz de direcionar especificamente a endonuclease Cas9 para o seu destino (SANDER; JOUNG, 2014; GORI et al., 2015) conforme mostrado na figura 9.

Diferentemente da clivagem do DNA guiada por proteína dos ZFNs e TALENs, a CRISPR/Cas9 depende de uma molécula de RNA para servir de guia levando assim a uma DSB específica (JINEK et al., 2013).

Mesmo a técnica de CRISPR sendo bastante promissora, existem algumas desvantagens sobre esta técnica que devem ser mencionadas. A possibilidade de ocorrerem mutações fora dos locais-alvo é um deles. Comparando com as técnicas de edição de genoma ZFN e TALEN, a CRISPR apresenta o maior potencial em causar mutações fora do alvo em células humanas. Existem uma variedade de genes que podem apresentar certa similaridade com o DNA alvo. A CRISPR reconhece esses genes que são homólogos além do DNA alvo e leva a uma DSB, induzindo a mutações em locais que não são desejáveis. (MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2010; JINEK et al., 2013; ZHANG; WEN; GUO, 2014).

Alguns pesquisadores tiveram sucesso ao realizar a correção da mutação do gene da hemoglobina, que origina a anemia falciforme. Células CD34+ de pacientes portadores de anemia falciforme foram isoladas, editadas por CRISPR/CAS9. O resultado desse procedimento foi a redução dos níveis de expressão do gene mutado e um aumento na expressão do gene selvagem (DEWITT et al., 2016).

4.1.2.4. **Comparação entre as técnicas de edição do genoma**

Fazendo uma comparação entre as principais técnicas para a edição discutidas nesse trabalho, a técnica de CRISPR/CAS9 se mostra mais vantajosa. As ZFNs e TALENs são baseadas em uma clivagem de DNA guiada por proteína que necessita de engenharia, seleção e validação complexas. Em comparação com estas técnicas, a CRISPR/Cas9 necessita apenas de um RNAg programável para gerar a clivagem de DNA, o que é relativamente barato e fácil de projetar e produzir (SANDER; JOUNG, 2014; ZHANG; WEN; GUO, 2014; GORI et al., 2015).

Em contraste com ZFNs e TALENs, que exigem a recodificação de proteínas usando regiões de DNA para cada novo local alvo, a técnica de CRISPR/Cas9 pode ser facilmente adaptada para direcionar qualquer sequência genômica, com a simples alteração do RNA guia. Isto torna a metodologia de edição genômica mediada por CRISPR mais fácil e simples comparando com as técnicas das ZFNs e dos TALENs. Outro ponto crucial que deve se fazer menção é a capacidade da técnica de CRISPR de multiplexação, na qual ao

utilizar vários RNAsg pode se atingir múltiplos locais em simultaneidade (GUPTA; MUSUNURU, 2014; SANDER; JOUNG, 2014; LAFOUNTAINE; FATHE; SMYTH, 2015).

Uma desvantagem de CRISPR/CAS9 é o tamanho da proteína CAS9, sendo maior do que um monômero TALEN e muito maior que um monômero ZFN. Isso implica em uma dificuldade para entregar a Cas9 por vetores virais. O RNAsg também deve ser entregue junto com a CAS9. Outra desvantagem é a capacidade do sistema CRISPR/CAS9 de gerar mutações fora do alvo (GUPTA; MUSUNURU, 2014).

A tabela 5 faz uma comparação entre as metodologias de edição genômica relacionando suas vantagens e desvantagens.

Tabela 5: Vantagens e desvantagens das técnicas de edição do genoma.

Nucleases	Vantagens	Desvantagens
ZFN	As DSBs originadas podem ser usadas para reparar o genoma por NHEJ ou HDR. Podem ser aplicadas em células somáticas ou células-tronco pluripotentes.	O desenho é caro e trabalhoso.
TALEN	Similar às ZFNs, as DSBs originadas podem ser usadas para reparar o genoma por NHEJ ou HDR, mas o domínio da FokI não é específico e a DBD é mais customizável.	Dificuldade de se construir plasmídeos que codifiquem TALENs, devido ao tamanho do complexo.
CRISPR	O sistema é de simples confecção e escalonamento, além de não ser tão caro. Sistemas de reparo pela NHEJ e HDR podem ser explorados. Direcionamento para DSB por uma molécula de RNA.	Pode induzir a mutações e rearranjos fora do alvo desejado. Levando a preocupações quanto a sua aplicabilidade terapêutica

Fonte: Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9 (GUPTA; MUSUNURU, 2014).

5. RESULTADOS OBTIDOS COM AS PRINCIPAIS TÉCNICAS

Alterar o genoma humano para expressar fenótipos desejáveis é uma realidade alcançada através do rápido avanço tecnológico nas áreas da biotecnologia e da biologia molecular. A associação entre fatores genéticos e a manifestação de doenças cada vez mais é elucidado por pesquisadores ao redor do mundo (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

O estímulo ao desenvolvimento ou a melhora de uma metodologia para a terapia ainda enfrentam barreiras como o desconhecimento parcial acerca das doenças a serem tratadas, a identificação do gene que causa a anomalia, o desenvolvimento de um veículo capaz de entregar um gene com eficiência e estabelecer uma relação entre a doença e sua ligação genética (WOLFF; LEDERBERG, 1994; MISRA, 2013).

O número de estudos sobre a terapia gênica bem com a quantidade de testes clínicos aprovados vem aumentando significativamente desde 1989, o que incita o avanço tecnológico nesta área (GINN et al., 2018).

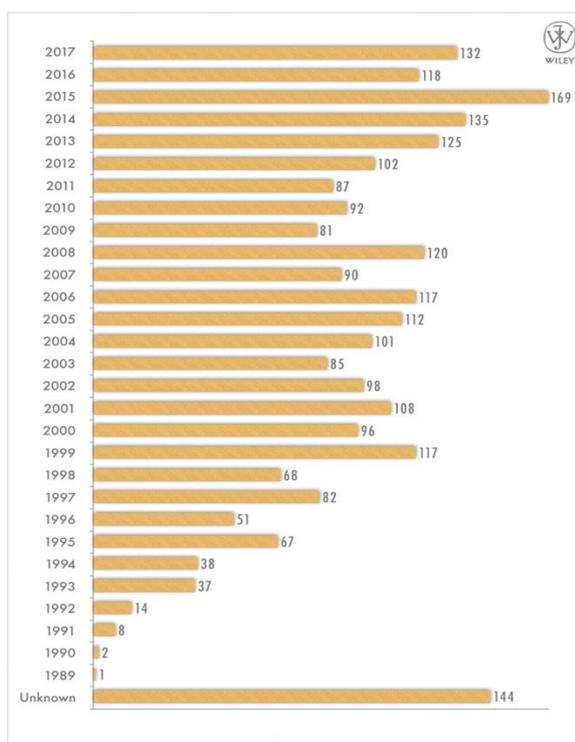


Figura 10: Número de ensaios clínicos aprovados em todo o mundo 1989–2017

Fonte: GINN et al., 2018

Um fato que também contribuiu nos últimos anos foi o nível de interesse crescente das indústrias farmacêuticas na terapia gênica. O licenciamento dos primeiros produtos voltados para a terapia gênica pelas agências reguladoras como o FDA, European marketing authorization (EMA), State food and drug administration of China (SFDA),

demonstram uma evolução no desenvolvimento de novos fármacos para tratamentos de disfunções genéticas. A tabela 4 mostra a relação dos primeiros fármacos aprovados para comercialização relacionando com o ano de aprovação, o fabricante, a agência regulamentadora e a indicação (GINN et al., 2018).

Tabela 4: Produtos aprovados para terapia genica.

Nome comercial	Data aprovação	de	Agencia aprovadora	Indicação	Fabricante
Gendicine	Outubro 2003	de	SFDA	Carcinoma celular de cabeça e pescoço	Shenzhen SiBiono GeneTech
Glybera	Novembro 2012	de	EMA	Deficiência de lipoproteína lipase	uniQure
Strimvelis	Junho de 2016		EMA	Deficiência de adenosina desaminase (ADA)	GlaxoSmithKline
Kymriah	Agosto de 2017		FDA	Leucemia linfoblástica aguda	Novartis Pharmaceuticals
Yescarta	Outubro 2017	de	FDA	Linfoma de células B	Kite Pharma, Incorporated
Luxturna	Dezembro 2017	de	FDA	Distrofia Retiniana	Spark Therapeutics Inc.

Fonte: Adaptado de GINN et al., 2018

Um fato que comprova o crescente interesse industrial sobre a terapia gênica foi o teste clínico realizado em 17 pacientes, no qual fez-se uma administração intravenosa de um vetor de adenovírus quimérico seletivo em pacientes com câncer de colorretal, câncer de pulmão, câncer urotelial e câncer renal. Este teste clínico demonstrou que a utilização do vetor gerou uma entrega tumor-específico na grande maioria dos pacientes sem serem observados efeitos adversos mais sérios (GARCIA-CARBONERO et al., 2017).

Alguns estudos empregando a terapia gênica para o tratamento da hemofilia empregando vetores de AAV demonstraram uma expressão melhorada dos transgenes usados. Nestes estudos, foram conduzidos 11 ensaios clínicos de terapia gênica para hemofilia e seis ensaios clínicos de fase I / II, utilizando o AAV como vetor dirigido ao fígado, expressando o fator VIII ou fator IX da coagulação. Além disso, o uso de vetores lentivirais baseados em células-tronco tem mostrado bons resultados para expressão do fator IX (DODD et al., 2014; SPENCER; RILEY; DOERING, 2016). A hemofilia A e a hemofilia

B são exemplos de doenças elegíveis ao tratamento com bases nestes vetores, podendo melhorar o prognóstico e alcançar a cura através da expressão vitalícia dos transgenes.

A enzima adenosina desaminase é responsável por converter os metabólitos tóxicos providos da degradação das moléculas de DNA e RNA no interior da célula em metabólitos menos tóxicos, sendo eles a desoxiadenosina e inosina, uma parte essencial da via de recuperação de purinas. A deficiência de ADA (do inglês, adenosine deaminase deficiency, ADA) resulta no acúmulo de metabólitos tóxicos dentro e fora das células, causando prejuízo no desenvolvimento de células T, B e NK. Geralmente resulta no desenvolvimento da SCID, que é caracterizada por infecções recorrentes e persistentes desde a infância. Sendo a ADA expressa em todos os tecidos, pacientes com ADA-SCID apresentam disfunções que acometem o esqueleto, trato gastrointestinal, pulmão, fígado e sistema nervoso (MUKHERJEE; THRASHER, 2013). Ensaios visando imunodeficiências primárias mostraram notável benefício clínico, com mais de 150 pacientes tratados usando tanto vetores retrovirais quanto lentivirais. Um estudo apresentou dados muito relevantes acerca do uso de vetores virais, sendo que foi observado que cerca de 40 pacientes com ADA-SCID obtiveram um aumento na taxa de sobrevivência sem a doença (GINN et al., 2018).

No ano de 1999, a terapia gênica teve um grande impacto negativo com a morte de Jesse Gelsinger, de 18 anos. O paciente possuía a deficiência de ornitina transcarboxilase e recebeu uma infusão do gene OTC corretivo encapsulado em uma dose com um vetor adenoviral recombinante. Esta infusão resultou em uma resposta imune severa ao vetor utilizado. O paciente faleceu 4 dias após a infusão, por falência múltipla de órgãos (MISRA, 2013). Entretanto, são vários os resultados positivos de sucessos em tratamentos com vetores virais. Isto torna cada vez mais atraente a aplicação destes métodos em outras patologias que possuem disfunções genéticas. As falhas terapêuticas também contribuem de certa forma para o aprimoramento de técnicas, uma vez que várias descobertas são feitas a cada ano, alterando conceitos estabelecidos previamente, inserindo novas definições e criando novas perspectivas de tratamentos.

O Gendicine foi um dos primeiros fármacos utilizando vetores virais a serem aprovados por uma agência reguladora no mundo. Um estudo avaliando uso comercial deste fármaco por 12 anos mostra resultados muito satisfatórios. Em mais de 30.000 pacientes este fármaco apresentou um registro de segurança excelente, fornecendo respostas significativamente melhores quando combinado com a quimioterapia e a radioterapia, fazendo um contraste com os padrões de terapias aplicadas isoladamente (ZHANG et al.,

2018). Fica evidente a aplicabilidade crescente da terapia gênica no contexto de tratamento de doenças, sendo de crucial importância o desenvolvimento de pesquisas sobre as técnicas já criadas e o incentivo ao desenvolvimento e/ou aprimoramento de novas tecnologias para aplicação desta terapia.

Outra forma de aplicar a terapia gênica ao tratamento de doenças baseia-se na edição do genoma humano através do uso de nucleases projetadas para regiões específicas do DNA (GUPTA; MUSUNURU, 2014). Todas as técnicas de edição genômica mencionadas nesse trabalho dependem dos mecanismos de reparo celular por NHEJ e HDR (SANDER; JOUNG, 2014; ZHANG; WEN; GUO, 2014; GORI et al., 2015).

Uma aplicação terapêutica para a técnica de ZFN é parar a expressão do gene *CCR5* e *CXCR4* em células T de humanos, visando o ganho de resistência à entrada do HIV. A capacidade dos ZFNs de silenciar a expressão dos genes *CCR5* e *CXCR4* foi largamente testada em células T CD4 + infectadas com HIV-1. As estratégias usando ZFNs têm sido empregadas para obter células nocauteadas do *CCR5* em pacientes com HIV-1, e um ensaio clínico demonstrou que a técnica ZFN parece ser segura e eficaz em humanos (KHALILI et al., 2015; PEREZ et al., 2008). Em um estudo foi utilizado as ZFNs para atacar e silenciar o gene *CCR5* em células T CD4 +, induzindo uma mutação benéfica no gene *CCR5*. Células T CD4 + autólogas modificadas por *CCR5* foram então introduzidas em alguns pacientes visando povoar o sistema imune com as células T modificadas. Esta abordagem aumentou a resistência ao vírus HIV-1 em 12 pacientes com infecção, as cargas virais dos pacientes aumentaram mais lentamente do que o normal, sugerindo que a tentativa ainda não foi a cura permanente, mas um atraso na evolução da doença (TEBAS et al., 2014).

A técnica de TALEN também foi usada para causar silenciamento do gene *CCR5*. Os resultados encontrados podem ser comparados aos resultados obtidos pelas ZFNs. Os TALENs mostraram atividade similar as ZFNs com cerca de 30% eficiência no silenciamento do gene *CCR5*, porém a TALEN se sobressaiu nesta comparação pois teve uma menor citotoxicidade e não apresentou aberrações no ciclo celular. Os TALENs ainda mostraram uma maior especificidade comparado a técnica da ZFN. Foi relatada a presença de 11 locais mutados que não correspondem ao local alvo na técnica de ZFN contra apenas 4 dos TALENs (MUSSOLINO et al., 2014).

Assim como a ZFNs e TALENS, a técnica de CRISPR/cas9 também foi utilizada para silenciar o gene *CCR5* em células T humanas, visando obter uma maior dificuldade do vírus a adentrar as células “resistentes” a infecção. No estudo fez-se uma comparação entre

as metodologias de CRISPR e TALEN para a obtenção de células tronco pluripotentes induzidas que são homozigotas para a mutação no gene *CCR5*. Os resultados mostram que ambas obtiveram 100 % de recombinação homóloga. Assim, a aplicação extensiva de CRISPR/Cas9 para editar o genoma do HIV-1 é muito atraente, visto que apresenta vantagens em relação as técnicas de ZFN e TALEN (YE et al., 2014).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ideia de curar doenças que até o presente momento permanecem sem cura, aumentar a perspectiva de vida de pacientes cuja sobrevivência é ínfima, evitar o desenvolvimento de doenças genéticas, bem como evitar a sua propagação e a associação de doenças a hereditariedade são motivos de inúmeros estudos. As técnicas de terapia gênica mostram-se como excelentes armas para compor o arsenal para a terapêutica de doenças que perpetuam na humanidade. Os usos desta terapia em alguns ensaios clínicos mostram resultados que são motivadores e corroboram para aplicação da terapia gênica, bem como a criação de legislações para regulamentar o uso nas mais diversas doenças.

Este estudo teve como finalidade abordar as tecnologias da terapia gênica como uma possível e promissora ferramenta para combater doenças genéticas. Mesmo com todo o desenvolvimento nesta área, ainda necessita de vários avanços e estudos complementares com a finalidade de contornar problemas encontrados ou mesmo a otimização das técnicas em questão.

A terapia gênica provavelmente será marcada por causar uma revolução na medicina atual, diminuindo o índice de mortalidade por disfunções genéticas.

7. REFERÊNCIAS

ARAUJO, Juliana Gonçalves de; ALVES, Elaine Maria Guimarães; BECHTLUFFT, Marcelo de Paiva. Perfil De Dna Plasmidial Em Bactérias Resistentes A Antibióticos Isoladas Do Ribeirão Paciência – Pará De Minas Mg. **Synthesis: Revista Digital FAPAM**, Pará de Minas, v. 1, n. 1, p.282-292, out. 2009.

ARBER, W. Host-Controlled Modification of Bacteriophage. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.365-378, out. 1965. Annual Reviews.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.19.100165.002053>

BALTES, Nicholas J.; GIL-HUMANES, Javier; VOYTAS, Daniel F.. Genome Engineering and Agriculture: Opportunities and Challenges. **Progress In Molecular Biology And Translational Science**, [s.l.], p.1-26, 2017. Elsevier.
<http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.03.011>

BLAESE, R. M. et al. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA- SCID: Initial Trial Results After 4 Years. **Science**, [s.l.], v. 270, n. 5235, p.475-480, 20 out. 1995. American Association for the Advancement of Science (AAAS).
<http://dx.doi.org/10.1126/science.270.5235.475>

BOGDANOVE, A. J.; VOYTAS, D. F.. TAL Effectors: Customizable Proteins for DNA Targeting. **Science**, [s.l.], v. 333, n. 6051, p.1843-1846, 29 set. 2011. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1204094>

BURTON, Edward A.; FINK, David J.; GLORIOSO, Joseph C.. Gene Delivery Using Herpes Simplex Virus Vectors. **Dna And Cell Biology**, [s.l.], v. 21, n. 12, p.915-936, dez. 2002. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/104454902762053864>

CARROLL, Dana. Genome Engineering With Zinc-Finger Nucleases. **Genetics**, [s.l.], v. 188, n. 4, p.773-782, ago. 2011. Genetics Society of America.
<http://dx.doi.org/10.1534/genetics.111.131433>

CHEN, Kunling; GAO, Caixia. TALENs: Customizable Molecular DNA Scissors for Genome Engineering of Plants. **Journal Of Genetics And Genomics**, [s.l.], v. 40, n. 6, p.271-279, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgg.2013.03.009>

CHIRA, Sergiu et al. Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. **Oncotarget**, [s.l.], v. 6, n. 31, p.30675-30703, 5 set. 2015. Impact Journals, LLC.
<http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.5169>

COHEN, S. N. et al. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 70, n. 11, p.3240-3244, 1 nov. 1973. Proceedings of the National Academy of Sciences.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.70.11.3240>

CONG, L. et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, Boston, v. 339, n. 6121, p.819-823, 3 jan. 2013. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1231143>.

COSTANZI-STRAUSS, Eugenia; STRAUSS, Bryan E.. Perspectives of gene therapy. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 94, n. 4, p. 211-222, dec. 2015. ISSN 1679-9836. Available at: <http://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/108767/107192>

COURA, Renata. Viral Vectors in Neurobiology: Therapeutic and Research Applications. **Molecular Virology**, [s.l.], p.75-92, 21 mar. 2012. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/32492>

COX, David Benjamin Turitz; PLATT, Randall Jeffrey; ZHANG, Feng. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 21, n. 2, p.121-131, fev. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3793>

DANI, Sergio U. Terapia Gênica: vetores para terapia gênica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio12/terapia.pdf>

DEWITT, M. A. et al. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. **Science Translational Medicine**, [s.l.], v. 8, n. 360, p.1-20, 12 out. 2016. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9336>

DODD, Megan et al. Sustained expression of coagulation factor IX by modified cord blood-derived mesenchymal stromal cells. **The Journal Of Gene Medicine**, [s.l.], v. 16, n. 5-6, p.131-142, maio 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jgm.2769>

FÉCCHIO, Dânia Caroline; Macedo, Luciana Conci; Ricci, Gléia c. Laverde. O uso da terapia gênica no tratamento de doenças. **Revista uningá review**, [s.l.], v. 21, n. 1, jan. 2018. Issn 2178-2571. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1614>

FRIEDMANN, Theodore. A brief history of gene therapy. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.93-98, out. 1992. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1092-93>

FRIEDMANN, Theodore. Stanfield Rogers: Insights into Virus Vectors and Failure of an Early Gene Therapy Model. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 4, n. 4, p.285-288, out. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/mthe.2001.0454>

GARCIA-CARBONERO, Rocio et al. Phase 1 study of intravenous administration of the chimeric adenovirus enadenotucirev in patients undergoing primary tumor resection. **Journal For Immunotherapy Of Cancer**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-13, 19 set. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s40425-017-0277-7>

GASPAR, H Bobby; THRASHER, Adrian J. Gene therapy for severe combined immunodeficiencies. **Expert Opinion On Biological Therapy**, [s.l.], v. 5, n. 9, p.1175-1182, set. 2005. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.5.9.1175>

GEHL, Julie; SKOVSGAARD, Torben; MIR, Lluís M. Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, [s.l.], v. 1569, n. 1-3, p.51-58, jan. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4165\(01\)00233-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4165(01)00233-1)

GILL, D R; A PRINGLE, I; HYDE, S C. Progress and Prospects: The design and production of plasmid vectors. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.165-171, 8 jan. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2008.183>

GINN, Samantha L. et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. **The Journal Of Gene Medicine**, [s.l.], e3015, 19 abr. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jgm.3015>

GONÇALVES, Giulliana Augusta Rangel; PAIVA, Raquel de Melo Alves. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. **Einstein (são Paulo)**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.369-375, set. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-45082017rb4024>

GORI, Jennifer L. et al. Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 26, n. 7, p.443-451, jul. 2015. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2015.074>

GUPTA, Rajat M.; MUSUNURU, Kiran. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 124, n. 10, p.4154-4161, 1 out. 2014. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci72992>

HERWEIJER, H; A WOLFF, J. Gene therapy progress and prospects: Hydrodynamic gene delivery. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.99-107, 30 nov. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3302891>

HOTTA, Akitsu; YAMANAKA, Shinya. From Genomics to Gene Therapy: Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing. **Annual Review Of Genetics**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.47-70, 23 nov. 2015. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-054926>

JACKSON, D. A.; SYMONS, R. H.; BERG, P.. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of Escherichia coli. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 69, n. 10, p.2904-2909, 1 out. 1972. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.69.10.2904>

JACOB, François; MONOD, Jacques. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 3, n. 3, p.318-356, jun. 1961. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836\(61\)80072-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836(61)80072-7)

JINEK, Martin et al. RNA-programmed genome editing in human cells. **Elife**, [s.l.], v. 2, 29 jan. 2013. ELife Sciences Organisation, Ltd.. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.00471>

KAY, Mark A.; GLORIOSO, Joseph C; NALDINI, Luigi. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.33-40, jan. 2001. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/83324>

KHALILI, Kamel et al. Genome editing strategies: potential tools for eradicating HIV-1/AIDS. **Journal Of Neurovirology**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.310-321, 26 fev. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13365-014-0308-9>

KHAN, Suliman et al. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. **International Journal Of Genomics**, [s.l.], v. 2016, p.1-14, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2405954>

KLINMAN, Dennis M. et al. FDA guidance on prophylactic DNA vaccines: Analysis and recommendations. **Vaccine**, [s.l.], v. 28, n. 16, p.2801-2805, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.025>.

KLUG, Aaron. The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation. **Annual Review Of Biochemistry**, [s.l.], v. 79, n. 1, p.213-231, 7 jun. 2010. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-010909-095056>

KRISHNA, S. S.. Structural classification of zinc fingers: SURVEY AND SUMMARY. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.532-550, 15 jan. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg161>

LAFONTAINE, Justin S.; FATHE, Kristin; SMYTH, Hugh D.c.. Delivery and therapeutic applications of gene editing technologies ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 494, n. 1, p.180-194, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.029>

LEHNMAN, I. R.. DNA Ligase: Structure, Mechanism, and Function. *Science*, [s.l.], v. 186, n. 4166, p.790-797, 29 nov. 1974. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**. <http://dx.doi.org/10.1126/science.186.4166.790>

LENZER, Jeanne. Arthur Kornberg. *Bmj*, [s.l.], v. 336, n. 7634, p.50-50, 3 jan. 2008. **BMJ**. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.39429.714086.be>

LIEBER, Michael R. et al. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 4, n. 9, p.712-720, set. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1202>

LINDEN, Rafael. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos Avançados**, [s.l.], v. 24, n. 70, p.31-69, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-40142010000300004>

LUNDSTROM, Kenneth. Viral Vectors in Gene Therapy. **Diseases**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.42-62, 21 maio 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/diseases6020042>

MARRAFFINI, Luciano A.; SONTHEIMER, Erik J.. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.181-190, 2 fev. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2749>.

MENCK, Carlos Frederico Martins; VENTURA, Armando Morais. Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. **Revista USP**. São Paulo. n. 75 p.50-61, 2007. Disponível em: <http://www.revistasusp.sibi.usp.br/pdf/revusp/n75/06.pdf>

MIR, Lluís M. et al. Electric Pulse-Mediated Gene Delivery to Various Animal Tissues. **Non-viral Vectors For Gene Therapy, Second Edition**: Part 2, [s.l.], p.83-114, 2005. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2660\(05\)54005-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2660(05)54005-7)

MOSCOU, M. J.; BOGDANOVA, A. J.. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. **Science**, [s.l.], v. 326, n. 5959, p.1501-1501, 29 out. 2009. American Association for the Advancement of Science (AAAS).
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1178817>

MUKHERJEE, Sayandip; THRASHER, Adrian J.. Gene therapy for PIDs: Progress, pitfalls and prospects. **Gene**, [s.l.], v. 525, n. 2, p.174-181, ago. 2013. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.098>

MUSSOLINO, Claudio et al. TALENs facilitate targeted genome editing in human cells with high specificity and low cytotoxicity. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 42, n. 10, p.6762-6773, 3 maio 2014. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku305>

NARDI, Nance Beyer; TEIXEIRA, Leonardo Augusto Karam; SILVA, Eduardo Filipe Ávila da. Terapia gênica. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.109-116, 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-81232002000100010>

PHAM, Phuc V.. Medical Biotechnology. **Omics Technologies And Bio-engineering**, [s.l.], p.449-469, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-804659-3.00019-1>

PEREZ, Elena e et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 26, n. 7, p.808-816, 29 jun. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1410>

NIENHUIS, A. W.. Development of gene therapy for blood disorders: an update. **Blood**, [s.l.], v. 122, n. 9, p.1556-1564, 10 jul. 2013. American Society of Hematology.
<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-04-453209>

ROMANO, Gaetano et al. Latest Developments in Gene Transfer Technology: Achievements, Perspectives, and Controversies over Therapeutic Applications. **Stem Cells**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.19-39, jan. 2000. Wiley-Blackwell.
<http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.18-1-19>

SANDER, Jeffrey D; JOUNG, J Keith. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.347-355, 2 mar. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2842>

SPENCER, H. T.; RILEY, B. E.; DOERING, C. B.. State of the art: gene therapy of haemophilia. **Haemophilia**, [s.l.], v. 22, p.66-71, jul. 2016. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/hae.13011>

SUN, Ning; ZHAO, Huimin. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): A highly efficient and versatile tool for genome editing. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 110, n. 7, p.1811-1821, 7 abr. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.24890>

TEBAS, Pablo et al. Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 370, n. 10, p.901-910, 6 mar. 2014. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1300662>.

TERHEGGEN, H. G. et al. Unsuccessful trial of gene replacement in arginase deficiency. **European Journal Of Pediatrics**, [s.l.], v. 119, n. 1, p.1-3, mar. 1975. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00464689>

URNOV, Fyodor D. et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 11, n. 9, p.636-646, set. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2842>

VARGHESE, Susan; RABKIN, Samuel D. Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy. **Cancer Gene Therapy**, [s.l.], v. 9, n. 12, p.967-978, 22 nov. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cgt.7700537>

VELLAI, T.; VIDA, G.. The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. **Proceedings Of The Royal Society Of London**. Series B: Biological Sciences, [s.l.], v. 266, n. 1428, p.1571-1577, 7 ago. 1999. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.1999.0817>

VERMA, Inder M.; WEITZMAN, Matthew D.. GENE THERAPY: Twenty-First Century Medicine. **Annual Review of Biochemistry**, [s.l.], v. 74, n. 1, p.711-738, jun. 2005. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.050304.091637>

VORBURGER, S. A. Adenoviral Gene Therapy. **The Oncologist**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.46-59, 1 fev. 2002. Alphamed Press. <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.7-1-46>

VOSS, Carsten. Production of plasmid DNA for pharmaceutical use. **Biotechnology Annual Review**, [s.l.], p.201-222, 2007. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s1387-2656\(07\)13008-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1387-2656(07)13008-8)

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C.. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, [s.l.], v. 171, n. 4356, p.737-738, abr. 1953. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/171737a0>.

WOLFF, Jon A.; LEDERBERG, Joshua. An Early History of Gene Transfer and Therapy. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.469-480, abr. 1994. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.1994.5.4-469>

WOLFF, J. et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**, [s.l.], v. 247, n. 4949, p.1465-1468, 23 mar. 1990. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1690918>

World Health Organization. Early cancer diagnosis saves lives, cuts treatment costs. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/early-cancer-costs/en/>

YE, Lin et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection. **Proceedings Of The**

National Academy Of Sciences, [s.l.], v. 111, n. 26, p.9591-9596, 9 jun. 2014. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1407473111>

ZHANG, F.; WEN, Y.; GUO, X.. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. **Human Molecular Genetics**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.40-46, 20 mar. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddu125>.

ZHANG, Wei-wei et al. The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.160-179, fev. 2018. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2017.218>