

## O PAPEL DO CRISPR/Cas9 NO ESTUDO DA DOENÇA GENÉTICA: FIBROSE CÍSTICA

### THE ROLE OF CRISPR/Cas9 IN THE STUDY OF GENETIC DISEASE: CYSTIC FIBROSIS

Luca Bueno Palhares Rocha<sup>1</sup>

**RESUMO:** A Fibrose Cística (FC) é considerada a doença genética letal mais comum em populações caucasianas, sendo está caracterizada por infecções crônicas e recorrentes do pulmão, insuficiência pancreática e elevados níveis de cloro no suor. Esta doença de herança autossômica recessiva é causada pela mutação no gene do Regulador da Condutância Transmembrana da Fibrose Cística, que induz ao organismo produzir secreções espessas e viscosas que obstruem os pulmões, o pâncreas e o ducto biliar. Muitos pacientes manifestam insuficiência pancreática, tendo como consequências dessa insuficiência: a má-absorção de nutrientes, especialmente, de proteínas e lipídeos e também complicações gastrointestinais. A FC normalmente é diagnosticada durante a infância, pelos programas de triagem neonatal, pelo teste do suor e análise genética. Em decorrência dos diversos sistemas envolvidos e da variabilidade e cronicidade da doença, é essencial uma abordagem multidisciplinar para auxiliar o paciente e sua família. A terapia atual da FC compreende a manutenção do estado nutricional, o uso de antibióticos para prevenção e tratamento de infecções, a remoção das secreções das vias aéreas com fisioterapia e mucolíticos, indicação de suplementos energéticos e dietas, apesar do tratamento ser apenas paliativo. A terapia gênica é um tratamento fundamentado na transferência de cópias do material genético sem mutação ao organismo de interesse, possibilitando a correção do fenótipo de distúrbios provocados por mutações genéticas. Com o avanço tecnológico e descobertas, a respeito da função dos genes e do material genético, foram desenvolvidas diversas metodologias capazes de corrigir o genoma humano. O sistema CRISPR/Cas9 (clustered regularly short palindromic repeats-CRISPR associated nucleases) tem-se destacado devido à sua versatilidade, capacidade de realizar a alteração desejada e simplicidade de manuseamento em laboratório. Diante o exposto, a FC tem sido alvo de estudos com a utilização da terapia genética.

1497

**Palavras – chave:** Fibrose Cística. CFTR. Terapia Gênica. Edição Gênica. CRISPR/Cas9.

**ABSTRACT:** Cystic Fibrosis (CF) is considered the most common lethal genetic disease in Caucasian populations, which is characterized by chronic and recurrent infections of the lung, pancreatic insufficiency and high levels of chlorine in sweat. This autosomal recessive inheritance disease is caused by the mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator gene, which induces the body to produce thick, viscous secretions that obstruct the lungs, pancreas and bile duct. Many patients manifest pancreatic insufficiency, the consequences of which are: malabsorption of nutrients, especially proteins and lipids, as well as gastrointestinal complications. CF is usually diagnosed during childhood, through neonatal screening programs, sweat testing and genetic analysis. Due to the various systems involved and the variability and chronicity of the disease, a multidisciplinary approach is essential to assist the patient and his family. Current CF therapy includes maintaining nutritional status, using

<sup>1</sup> Graduado em Biomedicina pela instituição Centro Universitário São Camilo, com habilitação na área de Biologia Molecular e Bioquímica. Realizei Iniciação Científica no departamento de Genética da UNIFESP durante a minha graduação, posteriormente fiz Estágio supervisionado no Instituto de Criminalística do Estado de São Paulo, e Atualmente sou TT3 bolsista FAPESP, no Instituto de Medicina Tropical (USP), Integrante do grupo CADDE (centre for arbovirus, discovery, diagnostics, genomics and epidemiology), integrante da equipe da Prof. Ester Sabino, renomada mundialmente. E-mail: lucarocha332@gmail.com.

antibiotics to prevent and treat infections, removing airway secretions with physiotherapy and mucolytics, indicating energy supplements and diets, although the treatment is only palliative. Gene therapy is a treatment based on the transfer of copies of genetic material without mutation to the organism of interest, enabling the correction of the phenotype of disorders caused by genetic mutations. With technological advances and discoveries, regarding the function of genes and genetic material, several methodologies capable of correcting the human genome have been developed. The CRISPR / Cas9 system (clustered regularly short palindromic repeats-CRISPR associated nucleases) has stood out due to its versatility, ability to perform the desired change and simplicity of handling in the laboratory. In view of the above, CF has been the target of studies with the use of gene therapy.

**Keywords:** Cystic Fibrosis. CFTR. Gene Therapy. Gene Edition. CRISPR/Cas9.

## 1. INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética, crônica e progressiva, sendo essa de herança autossômica recessiva, apresentando uma elevada taxa de casos ao redor do mundo, com incidência mundial de 1 para cada 2.500 nascidos vivos (JACKSON; GOSS, 2017), atingindo diferentes grupos étnicos. Essa é causada pela mutação no gene do Regulador da Condutância Transmembranar (CFTR) da Fibrose Cística (BILTON, 2008).

Esta doença genética apresenta um índice elevado de mortalidade, embora o prognóstico favorável tenha avançado de forma intensa ao longo do tempo. O índice de sobrevivência até o final da adolescência é de 75% dos casos, enquanto até a terceira década de vida é de 50% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). No ano de 2013 foram registrados cerca de 3.000 pacientes com FC no Brasil (REBRAFC, 2013). 1498

Em adolescentes e adultos os sintomas se agravam com complicação pulmonar infecciosa crônica, seguido de déficit do crescimento e desenvolvimento na puberdade, pancreatite, desconforto abdominal, síndrome de obstrução intestinal. Em mulheres pode levar a redução da fertilidade, enquanto no caso dos homens pode levar a esterilidade (ELIA et. al., 2014).

A terapia gênica também tem avançado bastante ao longo do tempo e tem como alvo tratar ou curar a doença, tratando-a diretamente pela sua origem genética (VILLATE-BEITIA et al., 2017). A FC acomete a vida de inúmeros pacientes, e não há uma alternativa terapêutica eficaz (BHANDARI et al., 2018). Em razão de seu caráter autossômico recessivo, ressalta-se o interesse e foco de terapias alternativas, como a terapia genética (HUBERT et al., 2016).

Uma nova técnica de edição de genomas, a CRISPR-Cas9, permite a modificação de genes específicos, sem alterar outros genes (TONELLI; RESENDE, 2018). Essa é aplicada em tratamento de doenças hereditárias, sendo vista como um método recente que é capaz de atuar no reparo do gene (BERGEL, 2017). O desenvolvimento desse método de edição genética gerou

novas possibilidades devido a sua versatilidade, facilidade de manuseamento e o baixo custo, o que faz desta uma técnica, que vem se tornando muito promissora para a terapia genética envolvendo a FC (HART; HARRISON, 2017).

## 2. OBJETIVO

Expor os aspectos que caracterizam a fibrose cística e seus acometimentos para os pacientes, discorrer sobre os atuais métodos de tratamento, destacando a terapia gênica e o uso da técnica molecular CRISPR/Cas9 para edição do DNA.

## 3. METODOLOGIA

Para a realização desta revisão bibliográfica foram utilizados artigos acadêmicos nacionais e internacionais publicados, disponíveis em bancos de dados digitais como Scielo, PubMed e plataformas digitais como Google Acadêmico, nos idiomas inglês e português. O período de publicação dos artigos utilizados é de 1996 até a atualidade. As buscas iniciaram-se a partir das palavras-chaves: “cystic fibrosis”, “CRISPR/Cas9” e “CFTR”.

## 4. DESENVOLVIMENTO

1499

### 4.1 Fibrose Cística

No organismo, a proteína CFTR está localizada na superfície apical das células epiteliais formando um canal de cloro. Na FC, a disfunção deste canal promove, ao longo do tempo, um distúrbio no transporte de cloro através da superfície luminal do epitélio celular, e desencadeia um influxo compensatório de sódio que visa manter a eletroneutralidade. Após o influxo compensatório, se tem em continuidade um influxo de água promovendo a desidratação da superfície celular, assim como, a produção do muco mais espesso que é característico da doença (CAMPOS et. al., 1996).

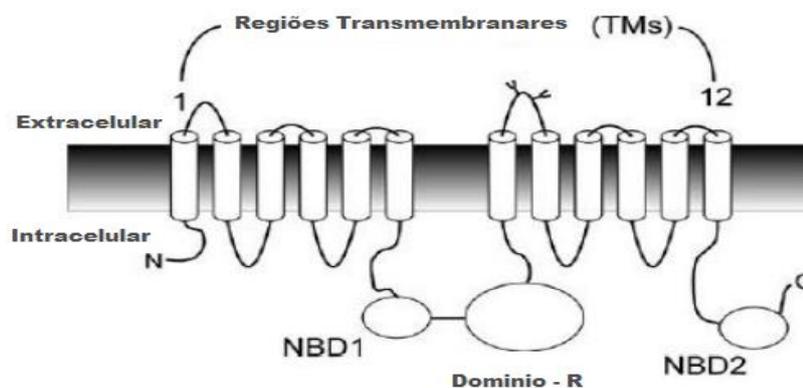
O paciente portador dessa doença apresenta secreções mucosas mais viscosas e espessas, que leva à obstrução dos ductos das glândulas exócrinas e contribuem para o aparecimento de três características básicas: doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência pancreática com má digestão e má absorção com conseqüente desnutrição secundária e níveis elevados de eletrólitos no suor (BENTLEY, 1999).

O gene que codifica esse canal localiza-se no braço longo do cromossomo 7 na região q21-31 (BEAUDET, 1992), e é formado por 250 Kb de DNA. Apresenta 27 éxons, codificando um

RNAm de 6,5 Kb. A proteína resultante, reguladora de transporte iônico, é composta por 1.480 aminoácidos, conhecida como proteína Reguladora da Condutância da Transmembrana da Fibrose Cística (CFTR), e é essencial para o transporte de íons através da membrana celular, estando envolvida na regulação do fluxo de íons de cloro, sódio e água (RIBEIRO et. al., 2002).

A proteína CFTR possui um poro, sendo esse composto por doze segmentos transmembranares (NUSSBAUM et. al., 2002). Ela apresenta cinco domínios sendo: dois domínios MSDs, dois domínios de ligação NBD<sub>1</sub> e NBD<sub>2</sub> e um domínio de regulação R, que contém múltiplos sítios de fosforilação. Dentre estes sítios, as serinas Ser-660 e Ser-813 são essenciais para o funcionamento do canal (Figura 1) (NUSSBAUM et. al., 2002; LI; NARREN, 2005). O domínio NBD realiza a interação por ligação e pela hidrólise de ATP que irá prover a energia essencial para que o canal seja realmente ativo. O domínio regulatório tem a capacidade de modular a atividade da proteína CFTR, podendo desencadear um efeito estimulante ou inibitório (WELSH, 2001; AKABAS, 2000).

**Figura 1 - A proteína CFTR apresenta 12 regiões transmembranares (organizadas em 2 grupos de 6), 2 NBDs (NBD<sub>1</sub> e NBD<sub>2</sub>) e o domínio R, ambos intracelulares.**



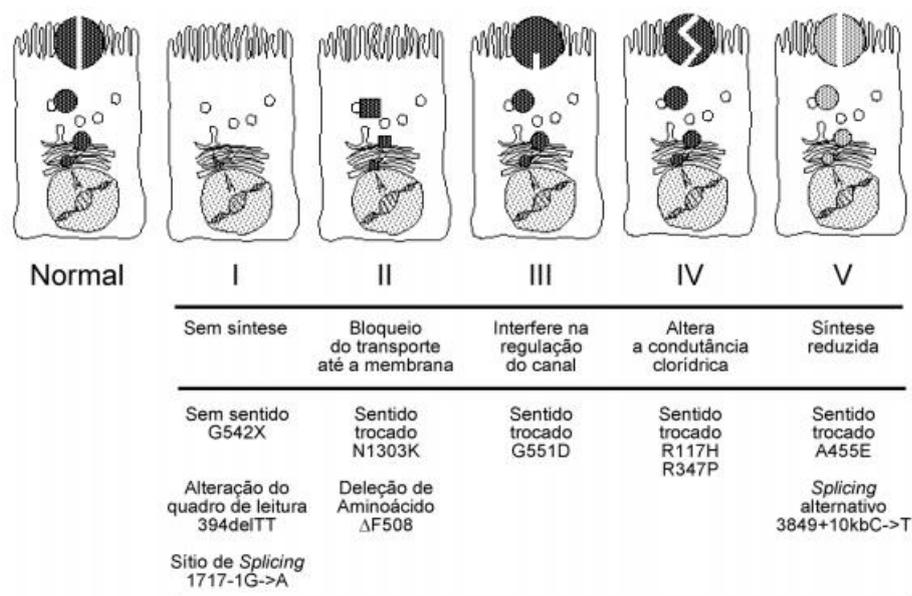
Fonte: Adaptado de Linsdell, 2006.

Atualmente já foram descritas na literatura mais de 1.800 mutações e, dentre estas, a perda da fenilalanina na posição 508 (DF508) é a mais frequente na população (RASKIN et. al., 2008). A mutação do gene CFTR pode ser dividida em seis classes (Figura 2), devido à alteração de seu mecanismo molecular. Essas são em grande parte mutações *non sense* que formam *stop-codons* prematuros, originando um RNA truncado instável. (ELBORN, 2016).

A mutação de classe I faz com que a CFTR não seja sintetizada, encontrada em 10% dos pacientes com FC. As mutações de classe II estão relacionadas com um defeito no seu processamento em nível de retículo endoplasmático (RE) ou complexo de Golgi, acarretando assim um dobramento incorreto da proteína, A mutação delta F508 faz parte desta classe (NUSSBAUM et. al. 2002) e, em consequência, a proteína é degradada dentro da organela ao invés de prosseguir às células secretoras para exercer suas funções reduzindo, assim, sua quantidade funcional na membrana apical da célula epitelial. É o defeito mais comum, contribuindo com cerca de 70% de todos os alelos FC nas populações caucasianas (MARSON; BERTUZZO; RIBEIRO, 2018).

Na mutação de classe III ocorre uma descompensação na regulação da proteína nos domínios de ligação de nucleotídeos (NBDs) e no domínio de regulação R enquanto as mutações de classe IV estão situadas em domínios transmembranares (MSDs), sendo compostos cada um com seis sequências transmembranares, resultando em uma condução defeituosa de cloreto. As mutações de classe V promovem uma redução da função da proteína CFTR. Já as mutações de classe VI são muito raras, devido à uma degradação progressiva da proteína (NUSSBAUM et. al., 2002; STANKE; TÜMMLER, 2016).

Figura 2: A representação esquematizada das classes de mutações genéticas da FC.



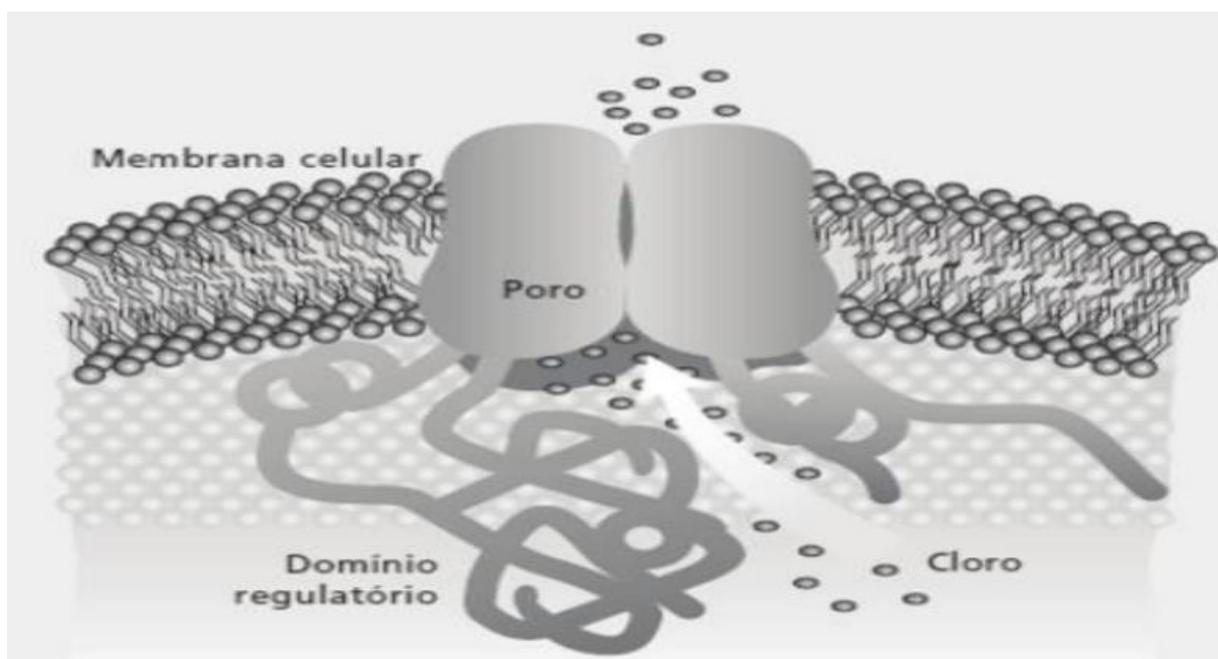
Fonte: Adaptado de Taylor, 1999.

Os fatores prognósticos associados à FC são bastante complexos, visto que a taxa de mortalidade está intimamente relacionada com o comprometimento respiratório que o paciente virá a manifestar, associado às demais complicações hepáticas, pancreáticas e decorrente desnutrição (BENTLEY, 1999).

#### 4.1.1 Proteína CFTR

Em condições normais, a proteína CFTR (Figura 3) é regulada positivamente via fosforilação. Diversas proteínas podem desempenhar esta função como: cinase de tirosina, proteína quinase C (PKC) e a proteína cinase dependente de guanosina monofosfato cíclico - GMPc (OSTEDGAARD et. al., 2001). Porém, está fosforilação é mediada principalmente por Proteína Cinase A (PKA). Na via de fosforilação por PKA, essa proteína é ativada pelo aumento da concentração de AMPc via adenilato ciclase (AC). Uma vez fosforilada, a CFTR torna-se ativa e possibilita o efluxo de íons de cloro através da membrana apical da célula epitelial (RODGERS; KNOX, 2001).

**Figura 3: Proteína CFTR.**



Fonte: Adaptado de Firmida et. al., 2011.

Os níveis mais elevados da expressão de CFTR são encontrados no intestino, no trato reprodutor, nas glândulas exócrinas, salivares e sudoríparas, nas vias aéreas e recentemente a expressão de CFTR foi descrita em células presentes na região do hipotálamo, algo que correlaciona a alguns sintomas neurológicos apresentados por pacientes com a doença. Demonstrando, dessa forma, que como o gene CFTR está presente em diversas células que podem ser encontradas em diferentes áreas do corpo humano, conseqüentemente os locais nos quais ele está presente carregarão alterações (NUSSBAUM et. al., 2002; GUO et al., 2009).

Com base nas alterações fisiológicas do transporte transmembranar de íons na FC, o polipeptídeo codificado pelo gene da FC, a proteína CFTR possui um fato característico, mesmo sendo membro da família de proteínas transportadoras, este apresenta função de canal iônico (JENTSCH et. al., 2005). Age como um canal na membrana apical da célula epitelial e transporta íons de cloro através da região da membrana ao interior da célula. A proteína CFTR é uma glicoproteína que está associada aos canais transportadores de membrana acoplados a ATP (WELSH et al., 2001). Em caso de mutações nesses sítios específicos há a possibilidade de alterações na seletividade do canal a ânions (AKABAS, 2000).

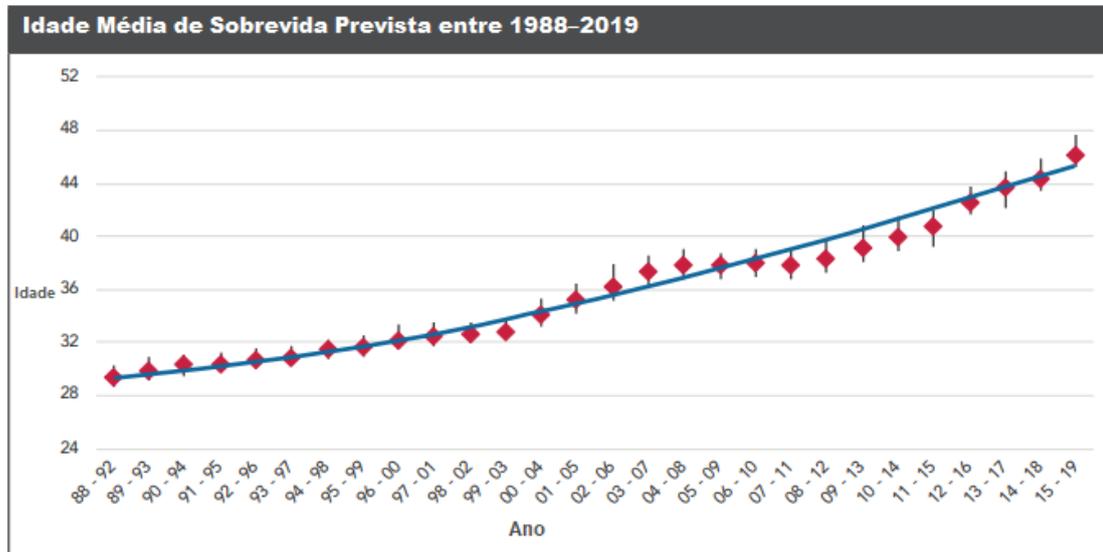
Nas células saudáveis, seus canais de íons de cloro, ao sofrerem estimulação pelo cálcio ou pelo AMPc, se abrem. Nos pacientes com FC este canal de cloro será estimulado apenas pelos íons cálcio, enquanto pelo AMPc será irresponsivo, resultando, ao longo do tempo, na diminuição da permeabilidade celular ao íon cloro. Em consequência da saída reduzida deste íon pelo canal, haverá um maior influxo de íons sódio visando manter a homeostase intracelular iônica entre cloro e sódio (ANDRADE et al., 2001).

Ao sinalizar o gene causador da doença, entende-se que o transporte de íons, como o cloreto e sódio, pela proteína CFTR será anormal (CABELLO et al., 2003). Com este comprometimento devido a escassa secreção de íons de cloro e o maior influxo de sódio e água pela célula, resulta em alterações físico-químicas das propriedades do muco, o tornando mais viscoso, desidratado, espesso e assim podendo comprometer os ductos de demais órgãos (MAGALHÃES et al., 2004).

#### **4.1.5 Tratamento da fibrose cística**

Atualmente o tratamento dos pacientes com FC tem evoluído constantemente e consiste em aliviar os desconfortos que podem variar conforme as manifestações clínicas do paciente, visando à melhoria da qualidade de vida, como também, a sobrevida (Gráfico 1).

Gráfico 1: A Idade Média prevista a sobrevida em pacientes com F.C entre 1986-2019.



Fonte: Adaptado de CFF Registry, 2019.

O tratamento dos pacientes com a doença, geralmente, é composto pela utilização de broncodilatadores que promovem o relaxamento da musculatura lisa, facilitando assim a mecânica respiratória. Os anti-inflamatórios, a terapia antimicrobiana, sendo associados a agentes mucolíticos e fluidificantes, permitem a redução da viscosidade do muco no local e conferem proteção contra a colonização do trato respiratório por bactérias (HUDOCK; CLANCY, 2017). 1504

## 4.2 TERAPIA GÊNICA

A utilização das técnicas de DNA recombinante, para a correção de um genoma, foi inspirada nas doenças genéticas monogênicas. Ou seja, a ideia era a de substituir ou complementar a expressão do gene disfuncional, por meio da inserção de uma ou mais cópias do gene terapêutico (PORTEUS et. al., 2006; O'CONNOR;CRYSTAL, 2006; BRINKMAN et. al., 2006). No entanto, o interesse pela terapia genética não é exclusivamente nas doenças monogênicas, já que a medicina moderna encara diversas doenças graves, nas quais, na melhor das hipóteses, apenas existe um tratamento paliativo. A intervenção por meio da terapia gênica, em determinados casos, possui o objetivo de reduzir ou evitar a progressão da doença; essa pode ser baseada na oportunidade de alterar mecanismos essenciais ou a fisiologia de células, órgãos e

sistemas que na doença são afetados, como, também, pode ser baseada no conhecimento de determinantes genéticos de suscetibilidade (CARDONE, 2007; FLOTTE, 2007).

A aplicação da terapia gênica ainda é experimental em diversos casos (LINDEN, 2010). A maioria dos procedimentos são conduzidos nos Estados Unidos, Europa e Austrália. O campo desta abordagem é extenso, com uma capacidade potencial para o tratamento de doenças causadas por desordens em genes recessivos, como no caso da FC, além de outras doenças como hemofilia, distrofia muscular e anemia falciforme, doenças genéticas adquiridas como câncer, e determinadas infecções virais, como AIDS (MISRA, 2013).

As terapias gênicas podem possibilitar a modificação do material genético por intermédio da reparação de genes que apresentem alterações como mutações em sítios específicos, visando o tratamento, visto que existem muitas doenças genéticas monogênicas que acometem a vida de inúmeras pessoas (GONÇALVES; PAIVA, 2017). Nos últimos anos, houve evolução sobre o conhecimento da FC, assim como, sobre os métodos de diagnóstico e tratamento. Este, por sua vez, consiste no alívio dos sintomas e disfunções orgânicas que os pacientes apresentam (DALCIN; SILVA, 2008).

1505

As nucleases são enzimas com a capacidade de romper as interações entre os nucleotídeos, que atuam como enzimas de restrição. Há 4 grandes grupos compostos por proteínas que possuem a habilidade de interagir com o DNA e são utilizadas na edição gênica: as nucleases baseadas nos seus fatores de transcrição eucariotas como zinc fingers (ZFN), as meganucleases que são provenientes dos elementos móveis microbianos genéticos, as transcription activator-like effectors (TALENs) que são provenientes da bactéria *Xanthomonas*, e a endonuclease Cas9 do sistema imune de algumas bactérias como *S. pyogenes* (HSU et al, 2014).

Uma das técnicas mais frequentemente aplicada consiste na tecnologia do DNA recombinante, em que o gene de interesse ou saudável é inserido em um vetor, este pode ser plasmidial, nanoestruturado ou viral, sendo esse último o mais utilizado, por conta de sua eficiência em invadir células e nelas introduzir seu material genético (MISRA, 2013).

Pela ampla possibilidade de aplicação do sistema CRISPR/Cas9 algumas doenças específicas são de maior interesse como alvo de estudos, como doenças cardíacas, respiratórias, como no caso da FC, osteoartrite e câncer, principalmente pois essas apresentam difícil resposta ao tratamento (MALI et al., 2013).

#### 4.2.1 CRISPR/Cas9

O CRISPR/Cas9 se baseia no uso de uma pequena sequência de RNA para direcionar a nuclease Cas9 ao local cromossômico que deve ser clivado, para então, a maquinaria molecular de reparo de DNA seja utilizada para modificar a sequência mutada (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2015). O sistema CRISPR-Cas9 visa a possibilidade de reparo permanente do genoma humano afetado. Em decorrência dessa possibilidade, a técnica tem sido fortemente explorada, principalmente quando se trata de doenças genéticas, como é o caso da FC (NICHOLSON; PEPPER, 2016).

Este mecanismo de defesa bacteriano se fundamenta na cópia de um segmento de DNA do patógeno para o genoma do hospedeiro, especificamente, ao locus CRISPR. Este locus no genoma do hospedeiro desempenha função de memória contra patógenos invasores. Portanto, diante de uma nova invasão, será transcrito uma cadeia de RNA CRISPR (crRNA). Este transcrito contém parte do material genético memorizado, que reconhecerá sequências do DNA de origem estranha e então irá se ligar por pareamento de bases, junto com uma Cas, gerando uma quebra de fita dupla (DSB) no DNA do invasor, assim inibindo o seu ciclo no organismo hospedeiro (SANDER; JOUNG, 2014; GORI et al., 2015; LAFOUNTAINÉ et. al., 2015).

1506

A estrutura da Cas9 é composta por dois domínios enzimáticos, o HNH e o RuvC. Tais domínios são responsáveis por clivar a cadeia de DNA (JINEK et al., 2013). Isso acontece caso a sequência alvo se encontre na região adjacente a uma pequena sequência conhecida como protospacer adjacent motif (PAM) (SANDER e JOUNG, 2014). O domínio HNH cliva a cadeia complementar de DNA, enquanto, o domínio RuvC possui a habilidade de clivar a cadeia alvo. Ao ser realizada uma análise estrutural do sistema CRISPR/Cas9 notou-se a existência de dois lóbulos, o de reconhecimento (REC) e um de nuclease (NUC). No REC a Cas9 se relaciona com o RNA-DNA de diversas maneiras, conforme a conformação adquirida, dessa forma, permitindo concluir que a nuclease Cas9 não detém nenhuma especificidade na orientação, sendo assim, essencial a presença do crRNA:tracrRNA para possibilitar a sua função (JINEK et al., 2014).

No sistema CRISPR/Cas9, o crRNA é combinado com o tracrRNA para formar o complexo crRNA:tracrRNA (SANDER; JOUNG, 2014), sendo que o crRNA é o responsável pela direção da endonuclease Cas9 para o DNA de interesse (ZHANG; WEN; GUO, 2014). Conseqüentemente, os crRNAs apresentam uma região chamada de protospaçadores, na qual



Acredita-se que esta técnica seja a mais promissora para a engenharia genética, dentre aquelas utilizadas na edição de DNA. O CRISPR-Cas9 se destaca pelo seu baixo custo e pela sua funcionalidade simples em comparação a outras técnicas já existentes (HSU; LANDER; ZHANG, 2014). As vantagens que o sistema CRISPR-Cas9 apresenta justifica sua utilização em estudos relacionados a FC e outras doenças genéticas, como sua eficácia, facilidade de utilização, especificidade e versatilidade (SANTOS et al., 2016).

Nos últimos anos, a técnica de CRISPR renovou o campo da biologia molecular assim como outras áreas como a medicina e a biotecnologia, após aplicações bem-sucedidas da tecnologia em modificações genéticas em mamíferos (LIU et al., 2018). Atualmente o sistema CRISPR/Cas9 se desenvolveu muito visando o aumento de sua eficiência e especificidade, com objetivo de reduzir o surgimento de artefatos como os efeitos *off-target* (XUE et al., 2015).

#### 4.3 Transportes do sistema CRISPR/Cas9

A engenharia genética tem um desafio constante quanto ao transporte do sistema CRISPR/Cas9 para a célula. Atualmente, há diferentes métodos eficazes para que haja o transporte de gRNA e Cas9 até a célula alvo (JINEK et al., 2013; KHAN et al., 2016). O avanço desta tecnologia possibilitou a realização de ensaios e estudos em células somáticas, visando determinar etapas de otimização do sistema de entrega ao alvo, especificidade e segurança quanto sua utilização. Esta tecnologia está sendo aplicada principalmente em doenças genéticas monogênicas que compõem cerca de 10 mil doenças, dentre elas está a FC (VIEIRA et al., 2016).

Um elemento importante para a terapia gênica são os vetores. O vetor é uma estrutura que atua como um veículo para a entrega do gene, esse deve fornecer os genes do tamanho exigido para a aplicação clínica; e não pode ser imunogênico (MISRA, 2013; KHAN et al., 2016). Estes vetores são divididos conforme sua forma de construção, como os vetores virais, plasmidiais e ribonucleoproteínas (EDELSTEIN et. al., 2007).

#### 4.4.2 CRISPR e CFTR

Modelos experimentais semelhantes ao fenótipo e sintomas da FC são cruciais para a configuração e avaliação de estratégias terapêuticas. As ferramentas de manipulação do genoma e os avanços da tecnologia CRISPR/Cas9 deram um grande impulso ao avanço das soluções de terapia genética. Essas ferramentas também são fundamentais para o avanço da terapia gênica e do desenvolvimento da técnica em geral, simplificando a produção de novos modelos celulares e

animais de FC (ROSEN et. al., 2018; SEMANIAKOU et. al., 2019). As células derivadas de pacientes são frequentemente usadas para testar a eficácia de um tratamento para uma determinada mutação. No entanto, considerando o alto número de variantes de CFTR associadas à FC, é muito difícil cobrir todo o repertório de mutação em modelos celulares homocigotos. Para superar essa limitação, modelos isogênicos para diferentes mutações foram criados usando HDR mediado por CRISPR/Cas9 em células epiteliais brônquicas imortalizadas, fornecendo ferramentas experimentais valiosas para o ensaio funcional de CFTR (VALLEY et. al., 2018).

A tecnologia CRISPR/Cas9 também foi aplicada para gerar novos modelos animais de CF. Uma ovelha nocaute foi gerada pela interrupção do gene CFTR com NHEJ mediado por CRISPR/Cas9. A ovelha CFTR - / - desenvolveu uma doença grave semelhante à FC, incluindo fibrose pancreática, obstrução intestinal e ausência de canais deferentes (FAN et. al., 2018). Para estudar especificamente a patologia causada pela mutação  $\Delta F508$  mais comum, modelos de ratos foram gerados explorando a via HDR ativada pela clivagem CRISPR/Cas9 em correspondência com a fenilalanina 508 do gene. A recombinação com o DNA do doador, contendo a deleção de três nucleotídeos, produziu um modelo de rato homocigoto para a mutação F508. Comparados com ratos knockout, eles mostraram uma atividade residual de CFTR e um fenótipo de CF consequentemente mais brando (DREANO et. al., 2019). Um camundongo carregando a mutação sem sentido G542X no locus CFTR foi gerado por nuclease CRISPR mostrando manifestações comuns de FC determinadas pela ausência do canal iônico CFTR, como obstrução intestinal e crescimento reduzido (MCHUGH et. al., 2018). A edição do genoma CRISPR é uma tecnologia muito promissora para gerar novas estratégias terapêuticas, bem como novas ferramentas experimentais valiosas para testar terapias para uma ampla variedade de mutações causadoras da FC (ROSEN et. al., 2018).

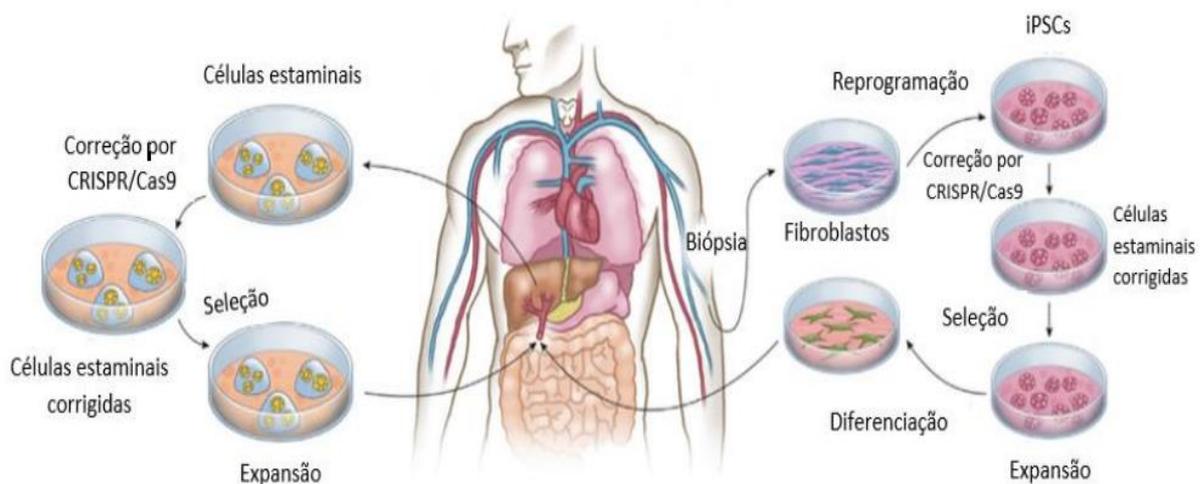
1509

Mais recentemente, utilizaram-se células estaminais intestinais para corrigir o gene CFTR. Primeiramente, foram isoladas as células estaminais de pacientes com FC e então essas células foram expandidas em culturas tridimensionais. Posteriormente, foram transferidas junto com o complexo CRISPR/Cas9, ambos direcionados para o gene CFTR e com um molde exógeno para a correção por HDR. Após realizar o sequenciamento genético foi possível demonstrar uma elevada eficácia na correção do gene CFTR, como também uma percentagem reduzida de efeitos *off-target* (SCHWANK et al., 2013).

A correção da mutação CFTR também foi realizada em modelos de iPSCs via abordagem da metodologia molecular do CRISPR/Cas9 (CRANE et al., 2015). As iPSCs foram obtidas por

reprogramação de fibroblastos somáticos de pele, obtidos de pacientes com FC em um estado de células-tronco embrionárias, transfectadas com um vetor de gRNA CFTR/Cas9 e posteriormente diferenciadas em direção a células epiteliais proximais das vias aéreas. A restauração da condutividade CFTR foi mostrada de forma semelhante às células epiteliais pulmonares derivadas de iPSC de tipo selvagem. Além disso, o CFTR foi capaz de alterar a conformação necessária para a translocação da membrana celular através do processo de N-glicosilação (FIRTH et al., 2015).

**Figura 12: Edição genética *ex vivo*, os genes podem ser editados de modo externo em células somáticas ou iPSCs reprogramadas, estas células são provenientes do paciente, e após serem corrigidas estas mesmas células serão selecionadas e após selecionadas haverá expansão celular para que possa ser posteriormente transplantada ao paciente.**



Fonte: Adaptado de SAVIC e SCHWANK, 2015.

Foram identificados nichos de células-tronco no pulmão, a maioria deles dando hospitalidade às células-tronco broncoalveolares. Em princípio, pode ser possível obter células-tronco pulmonares de um paciente com FC e manipulá-las com o CRISPR/Cas9 para então corrigir a mutação CFTR e reinseri-la em um destes nichos pulmonares, onde as células-tronco encontram seu microambiente, o qual será adequado para sua sobrevivência e crescimento. Os veículos de entrega viral e não viral são empregados para alcançar a expressão de CRISPR/Cas9 nas células do epitélio das vias respiratórias. O mais comumente utilizado é o vetor AAV (KOTTERMAN; SCHAFFER, 2014).

A via de administração ideal para a introdução de CRISPR/Cas9 no pulmão é representada por dispositivos de distribuição de aerossol, combinados com suspensões de

nanopartículas. As moléculas inaladas possuem o risco de serem aprisionadas e não superarem a barreira representada pelo muco patológico denso e viscoso que domina o epitélio alvo. Em qualquer caso, a via eletiva de administração deve ser local (por aerossol), já que uma administração sistêmica baseada em administração intravenosa, por razões anatômicas, atinge a região alveolar do pulmão, que é dedicada para as trocas gasosas, e não as ciliadas células do epitélio da superfície da árvore brônquica onde a proteína CFTR é expressa (RUGE et al., 2013).

A técnica molecular do CRISPR/Cas9 tem sido amplamente explorada, desenvolvida e aplicada em modelos de estudos avançados celulares e em modelos animais, com resultados promissores que podem ser aperfeiçoados ao longo dos anos e podem vir a ser utilizados como um tratamento eficaz para a FC, ao contrário do atual tratamento paliativo.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica molecular CRISPR/Cas9 pode ser bastante promissora para o futuro próximo. Esta técnica de edição genética pode apresentar aplicabilidade em diversas finalidades, desde sua utilização no tratamento genético à sua utilização na agricultura. Em torno disso existem diversas questões envolvendo o tratamento de doenças genéticas em humanos, que são discutidas ao longo dos anos, como, por exemplo, sobre o conhecimento da técnica do CRISPR/Cas9 em relação a seus efeitos após a substituição da região mutada. Quanto a sua utilidade a longo prazo ainda são necessárias pesquisas prospectivas.

1511

Para sua aplicação clínica, é necessário determinar, otimizar e aprimorar os métodos de entrega do sistema CRISPR/Cas9, seja *in vivo* quanto *ex vivo*. Os atuais vetores virais e não virais requerem mais estudos, nos quais deve ser analisado, para a técnica *in vivo*, a segurança da técnica, enquanto, para a terapia *ex vivo*, que associada às células somáticas e iPSCs por reprogramação celular, se deve analisar a capacidade de aumentar em grande número as células corrigidas.

Estes são alguns dos pontos desenvolvidos neste trabalho que podem levar a acreditar que o percurso da técnica do sistema CRISPR/Cas9 está avançando cada vez mais ao longo do tempo, e também, como esta técnica fascinante pode nos proporcionar novos métodos para a resolução de muitas doenças genéticas como é o caso dos pacientes com FC.

O profissional biomédico, assim como o pesquisador, apresenta um importante papel no desenvolvimento destas técnicas, pois com os conhecimentos da área da biologia molecular e genética, permite-se trabalhar em locais especializados que realizam pesquisas com engenharia

genética e, dessa forma, adicionar ideias que possam ser relevantes sobre sua utilização quanto a segurança e efetividade desta técnica.

## REFERÊNCIAS

- AKABAS, Myles H.. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Journal Of Biological Chemistry*, [S.L.], v. 275, n. 6, p. 3729-3732, 11 fev. 2000. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.6.3729>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10660517/>. Acesso em: 18 dez. 2020.
- ANDRADE EF, Fonseca DLO, Silva FAA, Menna-Barreto SS. Avaliação evolutiva da espirometria na fibrose cística. *J Bras Pneum*. 2001; 27(3):130-6.
- BEAUDET, Arthur L.. Genetic Testing for Cystic Fibrosis. *Pediatric Clinics Of North America*, [S.L.], v. 39, n. 2, p. 213-228, abr. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-3955\(16\)38292-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-3955(16)38292-x). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003139551638292X>. Acesso em: 18 nov. 2020.
- BENTLEY P. Understanding cystic fibrosis, improving life expectancy. *Nurs Times*. 1999; 95(43):50-61.
- BERGEL, Salvador Darío. El impacto ético de las nuevas tecnologías de edición genética. *Revista Bioética*, v. 25, n. 3, 2017.
- BHANDARI, N., Milic, N., Lamichhane, S., Blake, N., & Bhandari, A. (2018). Cystic Fibrosis: An overview with the impact of gene technology. *Asian Journal of Research in Biology*. [Consultado a 1 de agosto de 2020] Disponível em [https://www.researchgate.net/publication/326988724\\_CYSTIC\\_FIBROSIS\\_AN\\_OVERVIEW\\_WITH\\_THE\\_IMPACT\\_OF\\_GENE\\_TECHNOLOGY](https://www.researchgate.net/publication/326988724_CYSTIC_FIBROSIS_AN_OVERVIEW_WITH_THE_IMPACT_OF_GENE_TECHNOLOGY)
- BRINKMAN, R. R. et al. Human monogenic disorders – a source of novel drug targets. *Nat. Rev. Genet.*, v.7, n.4, p.249-60, 2006.73-278, May 8, 2008.
- CABELLO GMK, Cabello PH, Roig SRS, Fonseca A ,Carvalho ECD, Fernandes O. Rastreamento da fibrose cística usando-se a análise combinada do teste de IRT neonatal e o estudo molecular da mutação DF508. *J Bras Patol Med Lab*. 2003; 39(1):15-20
- CAMPOS SK, Barry MA. Current advances and future challenges in adenoviral vector biology and targeting. *Curr Gene Ther*. 2007 Jun;7(3):189-204. Doi: 10.2174/156652307780859062
- CARDONE, M. Prospects for gene therapy in inherited neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurol.*, v.20, n.2, p.151-8, 2007.
- CRANE, A. M., Kramer, P., Bui, J. H., Chung, W. J., Li, X. S., Gonzalez-Garay, M. L., et al. (2015). Targeted correction and restored function of the CFTR gene in cystic fibrosis induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep*. 4, 569-577. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.02.005
- DALCIN, Paulo de Tarso Roth; Silva, Fernando Antônio de Abreu e. Fibrose cística no adulto: aspectos diagnósticos e terapêuticos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 107-117, fev. 2008. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-37132008000200008](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132008000200008). Acesso em: 01 dez. 2020.
- DREANO E., Bacchetta M., Simonin J., Galmiche L., Usal C., Slimani L., Sadoine J., Tesson L., Anegon I., Concordet J., et al. Characterization of two rat models of cystic fibrosis—KO and F508del CFTR—Generated by Crispr-Cas9. *Anim. Models Exp. Med*. 2019;2:297-311. doi: 10.1002/ame2.12091.
- ELBORN, J Stuart. Cystic fibrosis. *The Lancet*, [S.L.], v. 388, n. 10059, p. 2519-2531, nov. 2016. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)00576-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(16)00576-6). Disponível em: [https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736\(16\)00576-6.pdf](https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736(16)00576-6.pdf). Acesso em: 09 dez. 2020.

EDELSTEIN ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J Gene Med.* 2007 Oct;9(10):833-42. doi: 10.1002/jgm.1100. PMID: 17721874

ELIA, Jlenia; Mazzilli, Rossella; Delfino, Michele; Piane, Maria; Bozzao, Cristina; Spinosa, Vincenzo; Chessa, Luciana; Mazzilli, Fernando. Impact of Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) gene mutations on male infertility. *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia*, [S.L.], v. 86, n. 3, p. 171-174, 30 set. 2014. PAGEPress Publications. <http://dx.doi.org/10.4081/aiua.2014.3.171>. Disponível em: <https://www.pagepressjournals.org/index.php/aiua/article/view/aiua.2014.3.171/4200>. Acesso em: 12 dez. 2020.

FAN Z., Perisse I.V., Cotton C.U., Regouski M., Meng Q., Domb C., Van Wettere A.J., Wang Z., Harris A., White K.L., et al. A sheep model of cystic fibrosis generated by CRISPR/Cas9 disruption of the CFTR gene. *JCI Insight.* 2018;3:1-12. doi: 10.1172/jci.insight.123529.

FIRTH, A. L., Menon, T., Parker, G. S., Qualls, S. J., Lewis, B. M., Ke, E., et al. (2015). Functional gene correction for cystic fibrosis in lung epithelial cells generated from patient iPSCs. *Cell Rep.* 12, 1385-1390. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.062

FLOTTE, T. R. Gene therapy: the first two decades and the current state-of-the-art. *J. Cell Physiol.*, v.213, n.2, p.301-5, 2007.

GONÇALVES, Giulliana Augusta Rangel; Paiva, Raquel de Melo Alves. *Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas.* Einstein (São Paulo), v. 15, n. 3, p. 369-375, 2017.

GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA (GBEFC). Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC). Acessado em 11 de março de 2020. Disponível em: [http://conteudosportal.com.br/GBEFC/wp-content/uploads/2016/03/REBRAFC\\_2013.pdf](http://conteudosportal.com.br/GBEFC/wp-content/uploads/2016/03/REBRAFC_2013.pdf)

GUO, Yong; SU, Min; Mcnutt, Michael A.; Gu, Jiang. Expression and Distribution of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Neurons of the Human Brain. *Journal Of Histochemistry & Cytochemistry*, [S.L.], v. 57, n. 12, p. 1113-1120, 3 ago. 2009. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1369/jhc.2009.953455>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2778084/>. Acesso em: 03 dez. 2020;

1513

HART, S. L., & Harrison, P. T. (2017). Genetic therapies for cystic fibrosis lung disease. *Human Molecular Genetics*, 34. doi: 10.1093/hmg/ddr104

HSU, Patrick D.; Lander, Eric S.; Zhang, Feng. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, [S.L.], v. 157, n. 6, p. 1262-1278, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867414006047>. Acesso em: 18 dez. 2020.

HUBERT, D., Bui, S., Marguet, C., Colomb-Jung, V., Murriss-Espin, M., Corvol, H., & Munck, A. (2016). Nouvelles thérapeutiques de la mucoviscidose ciblant le gène ou la protéine CFTR. *Revue Des Maladies Respiratoires*, 33(8), 658-665. doi: 10.1016/j.rmr.2015.11.010

HUDOCK, Kristin M.; Clancy, John Paul. An update on new and emerging therapies for cystic fibrosis. *Expert Opinion On Emerging Drugs*, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 331-346, 2 out. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14728214.2017.1418324>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14728214.2017.1418324?journalCode=iemdz0>. Acesso em: 18 dez. 2020.

JINEK M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, Anders C, Hauer M, Zhou K, Lin S, Kaplan M, Iavarone AT, Charpentier E, Nogales E, Doudna JA. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science.* 2014 Mar 14;343(6176):1247997. doi: 10.1126/science.1247997. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24505130; PMCID: PMC4184034.

JINEK M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife.* 2013 Jan 29;2:e00471. doi: 10.7554/eLife.00471. PMID: 23386978; PMCID: PMC3557905.

JENTSCH TJ, Maritzen T, Zdebik AA. Chloride channel diseases resulting from impaired trans epithelial transport or vesicular function. *J Clin Invest.* 115: 2039-2046. 2005

KHAN FA, Pandupuspitasari NS, Chun-Jie H, Ao Z, Jamal M, Zohaib A, Khan FA, Hakim MR, ShuJun Z. CRISPR/Cas9 therapeutics: a cure for cancer and other genetic diseases. *Oncotarget.* 2016 Aug 9;7(32):52541-52552. doi: 10.18632/oncotarget.9646. PMID: 27250031; PMCID: PMC5239572.

KOTTERMAN MA, Chalberg TW, Schaffer DV. Viral vectors for gene therapy: translational and clinical outlook. *Annu Rev Biomed Eng.* 2015 Dec;17:63-89. Doi: 10.1146/annurev-bioeng-071813-104938

LAFOUNTAINÉ JS, Fathe K, Smyth HD. Delivery and therapeutic applications of gene editing technologies ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9. *Int J Pharm.* 2015 Oct 15;494(1):180-94. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.08.029. Epub 2015 Aug 13. PMID: 26278489.

LI, Chunying; NAREN, Anjaparavanda P.. Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. *Pharmacology & Therapeutics*, [S.L.], v. 108, n. 2, p. 208-223, nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.004>. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/7806404\\_Li\\_C\\_Naren\\_A\\_P\\_Macromolecular\\_complexes\\_of\\_cystic\\_fibrosis\\_transmembrane\\_conductance\\_regulator\\_and\\_its\\_interacting\\_partners\\_Pharmacol\\_Ther\\_108\\_208-223Reviews\\_macromolecular-complex\\_regulation\\_of\\_CFTR](https://www.researchgate.net/publication/7806404_Li_C_Naren_A_P_Macromolecular_complexes_of_cystic_fibrosis_transmembrane_conductance_regulator_and_its_interacting_partners_Pharmacol_Ther_108_208-223Reviews_macromolecular-complex_regulation_of_CFTR). Acesso em: 05 nov. 2020.

LINDEN R. Gene therapy: what it is, what it is not and what it will be. *Estud Av.* 2010;24(70):31-69.

MAGALHÃES M, Britto MCA, Becerra PGM, Veras A. Prevalência de bactérias potencialmente patogênicas em espécimes respiratórias de fibrocístico do Recife. *J Bras Pat Med Lab.* 2004; 40(4):223-7

MCHUGH D.R., Steele M.S., Valerio D.M., Miron A., Mann J., Lepage D.F., Conlon R.A., Cotton C.U., Drumm M.L., Hodges C.A. A G542X cystic fibrosis mouse model for examining nonsense mutation directed therapies. *PLoS ONE.* 2018;11-14. doi: 10.1371/journal.pone.0199573

1514

MALI P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods.* 2013 Oct;10(10):957-63. doi: 10.1038/nmeth.2649. PMID: 24076990; PMCID: PMC4051438.

MALI P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang L, Church GM. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol.* 2013 Sep;31(9):833-8. doi: 10.1038/nbt.2675. Epub 2013 Aug 1. PMID: 23907171; PMCID: PMC3818127.

MARSON FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir Med.* 2016;4(8):e37-e38. doi:10.1016/S2213-2600(16)30188-6

MISRA S. Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. *J Assoc Physicians India.* 2013 Feb;61(2):127-33. PMID: 24471251.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018. Disponível em <https://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-da-triagem-neonatal/fibrose-cistica-fc> Acessado em 14 de março de 2020.

NICHOLSON, Samantha Anne; Pepper, Michael Sean. CRISPR-Cas: Revolutionising genome engineering. *South African Medical Journal*, [S.l.], v. 106, n. 9, p. 870-871, aug. 2016. ISSN 2078-5135. Available at: <<http://www.samj.org.za/index.php/samj/article/view/11061>>. Date accessed: 11 Mar. 2021. doi:10.7196/SAMJ.2016.v106i9.11061

NUSSBAUM RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson Genética Médica*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara – Koogan; 2002.

O'CONNOR, T. P.; CRYSTAL, R. G. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nat. Rev. Genet.*, v.7, n.4, p.261-76, 2006.

OSTEDGAARD LS, Baldursson O, Welsh MJ. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl channel by its R domain. *J Biol Chem.* 276: 7689-7692. 2001

PORTEUS MH, Connelly JP, Pruett SM. A look to future directions in gene therapy research for monogenic diseases. *PLoS Genet.* 2006 Sep;2(9):1285-92. Doi: 10.1371/journal.pgen.0020133

ROSEN B.H., Chanson M., Gawenis L.R., Liu J., Sofoluwe A., Zoso A., Engelhardt J.F. Animal and model systems for studying cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 2018;17:S28-S34. doi: 10.1016/j.jcf.2017.09.001.

RASKIN S, Pereira-Ferrari L, Reis FC, Abreu F, Marostica P, Rozov T. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. *J Cyst Fibros.* 2008;7(1):15-22

RASKIN S. Estudo multicêntrico de bases da genética molecular e da epidemiologia da fibrose cística em populações brasileiras [teste]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2001.

RIBEIRO, Jose Dirceu; RIBEIRO, Maria Ângela G. de O.; RIBEIRO, Antonio Fernando. Controvérsias na fibrose cística: do pediatra ao especialista. *J. Pediatr. (Rio J.)*, Porto Alegre, v. 78, supl. 2, p. 171-186, Dec. 2002. Disponível Em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0021-75572002000800008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572002000800008&lng=en&nrm=iso)>. acessado em 12 Fev. 2021. <https://doi.org/10.1590/S0021-75572002000800008>

RODGERS HC, Knox AJ. Pharmacological treatment of the biochemical defect in cystic fibrosis airways. *Eur Respir J.* 17: 1314-1321. 2001.

RUGE, C. A., Kirch, J., and Lehr, C.-M. (2013). Pulmonary drug delivery: from generating aerosols to overcoming biological barriers-therapeutic possibilities and technological challenges. *Lancet Respir. Med.* 1, 402-413. doi: 10.1016/S2213-2600(13)70072-9

SANDER JD, Joung JK. Sistemas CRISPR-Cas para edição, regulação e segmentação de genomas. *Nat Biotechnol.* 2014 Abr;32(4):347-55. doi: 10.1038/nbt.2842. Epub 2014 Mar 2. 24584096; PMC402601.

SANDER JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulation and targeting genomes. *Nature Biotechnol.* 2014;32(4):347-55.

1515

SEMANIAKOU A., Croll R.P., Chappe V. Animal models in the pathophysiology of cystic fibrosis. *Front. Pharmacol.* 2019;9:1-16. doi: 10.3389/fphar.2018.01475.

SCHWANK G. Andersson-Rolf A. Koo B.K. Sasaki N. Clevers H. Generation of BAC transgenic epithelial organoids. *PLoS ONE.* 2013; 8: e76871

SCHWANK G. Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, Sasaki N, Boymans S, Cuppen E, van der Ent CK, Nieuwenhuis EE, Beekman JM, Clevers H. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell.* 2013 Dec 5;13(6):653-8. doi: 10.1016/j.stem.2013.11.002. PMID: 24315439.

STANKE F, Tümmler B. Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir Med.* 2016;4(8):e36. doi:10.1016/S2213-2600(16)30147-3

TONELLI FCP, Resende RR. CRISPR: a técnica de engenharia genética que pode mudar o mundo! 2016. 3(7). DOI: [ Acesso em 1 de agosto de 2020]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15729/nanocellnews.2016.02.26.002>

VASCONCELOS, Maria José Vilaça de; Figueiredo, José Edson Fontes. Tecnologia CRISPR-Cas para edição genômica. Embrapa Milho e Sorgo Documentos (INFOTECA-E), 2015.

VALLEY H.C., Bukis K.M., Bell A., Cheng Y., Wong E., Jordan N.J., Allaire N.E., Sivachenko A., Liang F., Bihler H., et al. Isogenic cell models of cystic fibrosis-causing variants in natively expressing pulmonary epithelial cells. *J. Cyst. Fibros.* 2019;18:476-483. doi: 10.1016/j.jcf.2018.12.001.

VIEIRA GV, Cecílio NT, Arruda LM, Sales KU. Visão geral do mecanismo básico de ação. In: Pereira TC, organizador. Introdução à técnica de CRISPR. Ribeirão Preto: Cubo; 2016. Cap. 2. p. 54.

VILLATE-BEITIA, I., Zarate, J., Puras, G., & Pedraz, J. L. (2017). Gene delivery to the lungs:pulmonary gene therapy for cystic fibrosis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*,43(7), 1071–1081. doi: 10.1080/03639045.2017.1298122.

WELSH MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic Fibrosis. The metabolic and molecular bases of inherited disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. New York:McGraw-Hill; 2001. P. 5121-80.