

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Gabriel Pinto Aires

**EDIÇÃO GENÉTICA COM CRISPR/Cas NO CONTEXTO DA FIBROSE CÍSTICA:
REVISÃO INTEGRATIVA**

Porto Alegre

2021

Gabriel Pinto Aires

**EDIÇÃO GENÉTICA COM CRISPR/Cas NO CONTEXTO DA FIBROSE CÍSTICA:
REVISÃO INTEGRATIVA**

Trabalho de conclusão do curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito para colação de grau.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon.

Porto Alegre

2021

Gabriel Pinto Aires

EDIÇÃO GENÉTICA COM CRISPR/Cas NO CONTEXTO DA FIBROSE CÍSTICA:

REVISÃO INTEGRATIVA

Trabalho de conclusão do curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito para colação de grau.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Simone Martins de Castro

Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Janira Prichula

Doutora pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Apresentação do ARTIGO

A revisão intitulada EDIÇÃO GENÉTICA COM CRISPR/Cas NO CONTEXTO DA FIBROSE CÍSTICA: REVISÃO INTEGRATIVA, será submetido à revista “Clinical & Biomedical Research” do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. ISSN: 2357-9730.

https://www.hcpa.edu.br/downloads/pesquisa/instrucoes_autores_port_06abril.pdf

Este manuscrito seguirá as normas de redação contidas no final do trabalho.

Edição genética com CRISPR/Cas no contexto da fibrose cística: revisão integrativa

Gabriel Pinto Aires¹, Ana Paula Guedes Frazzon²

¹Discente do curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

²Docente do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

RESUMO

A fibrose cística (FC) é uma das doenças recessivas monogênicas mais estudadas. A doença pode ser tratada com tratamentos específicos, entretanto, o prognóstico ainda permanece muito ruim e limitado. A expectativa média de sobrevida atual para os pacientes com fibrose cística no mundo está em torno de 44 anos. Apesar de ser uma doença bastante estudada, alternativas terapêuticas têm sido desenvolvidas para encontrar um tratamento definitivo para os pacientes, dentre elas, cabe destacar a terapia com Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* – CRISPR). Como ferramenta de edição genética, o método CRISPR tem ampla aplicação na biologia molecular, e vem sendo utilizado para elucidar respostas da FC e das possíveis alternativas terapêuticas, por meio de edições direcionadas para o desenvolvimento de modelos *in vivo*, modelos *in vitro*, e potenciais terapias gênicas. Nessa revisão foram relatados estudos que traziam como ênfase a utilização do CRISPR como instrumento de pesquisa, observando suas aplicações principais, desfechos mais relevantes e desafios encontrados durante o processo. É imperativo os benefícios e a evolução nesse campo de estudo e os potenciais resultados da aplicação clínica do CRISPR.

Palavras-chave: CRISPR, Fibrose Cística, edição genética.

ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is one of the most widely studied monogenic recessive diseases. The disease can be treated with specific therapy; however, the prognosis still remains very poor and limited. The current average survival expectancy for cystic fibrosis patients worldwide is around 44 years. Despite being a well-studied disease, therapeutic alternatives have been developed to find a definitive treatment for patients, one of them is the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) therapy. As a genetic editing tool, the CRISPR method has wide application in molecular biology, and is being used for clarifying CF responses and possible therapeutic alternatives through edits aimed at the development of *in vivo* models, *in vitro* models, and potential gene therapies. In this review, studies that emphasized the use of CRISPR as a research tool were reported, observing its main applications, most relevant outcomes and challenges encountered during the process. The benefits and evolution in this field of study and the potential results of the clinical application of CRISPR are imperative.

Keywords: CRISPR, Cystic Fibrosis, gene editing.

INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) é uma das doenças recessivas monogênicas mais estudadas e referenciadas da genética humana¹. Ela é caracterizada geneticamente por mutações no gene CFTR (do inglês *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), que codifica uma proteína de mesmo nome, e por manifestações fenotípicas que afetam o funcionamento de diversos órgãos. Essa doença pode causar insuficiência pancreática, ausência bilateral congênita de ductos deferentes, obstrução intestinal, e complicações pulmonares como infecções bacterianas e bronquiectasia². As mutações no gene CFTR mais frequentes são F508del, G542X, G551D, R553X e N1303K².

A frequência de FC no mundo é de 1:2000 a 1:3000. No Brasil, a incidência varia de acordo com a região. No estado do Rio Grande do Sul, parece aproximar-se da população caucasiana centro-européia (1:2000 a 1:5000), enquanto que, em Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina, reduz-se para cerca de 1:9.000 a 1:9500 nascidos vivos³. A sobrevida média dos doentes nos Estados Unidos é de 46,2 anos, e, no Brasil, essa estimativa é de 43,8 anos⁴.

A doença pode ser tratada com tratamentos específicos, mas o prognóstico ainda permanece muito ruim e limitado. Aproximadamente 35% dos pacientes morrem enquanto esperam por um transplante de pulmão. Sob essa perspectiva, os avanços no regime terapêutico, que incluem o controle das infecções pulmonares, o uso de mucolíticos, a reposição de enzimas pancreáticas, o uso de suplementos alimentares, a fisioterapia respiratória e a prática orientada de exercício físico, influenciam a sobrevida desses pacientes⁴.

Apesar dos diversos avanços sobre a doença, ainda existe a necessidade de encontrar tratamento definitivo para os pacientes⁵. Dessa forma, alternativas terapêuticas estão sendo desenvolvidas, dentre elas estão os medicamentos moduladores da proteína CFTR como Ivacaftor⁶,

os sistemas de edição genética de proteínas em dedos de zinco (do inglês *Zinc Finger Protein* -ZFP)⁷ e a técnica de CRISPR⁸. As técnicas baseadas em CRISPR, além do baixo custo, possuem a vantagem de serem simples, apresentando alta eficiência e boa repetibilidade⁹. Apresentam versatilidade nas suas aplicações, sendo úteis para o desenvolvimento de modelos animais de FC^{10,11}, para a caracterização fenotípica de mutações no gene CFTR¹², e vem apresentando-se como potencial alternativa terapêutica¹³.

Com o objetivo de avaliar alternativas para o tratamento de FC e a evolução dos estudos sobre o uso da ferramenta CRISPR, neste trabalho foram avaliados artigos científicos que empregam métodos de edição genética baseados nas técnicas CRISPR no contexto da FC, observando quais as aplicações e achados mais importantes desses estudos e seus desafios futuros.

METODOLOGIA

Esta é uma revisão integrativa da literatura realizada com base nas recomendações do protocolo PRISMA¹⁴. Os artigos científicos foram selecionados nos portais PUBMED e BVS, usando os descritores “*Cystic Fibrosis*”, “CRISPR” e “*therapy*” com o uso do operador booleano AND.

Os critérios de inclusão utilizados consideraram artigos publicados a partir de 2016, em qualquer idioma. Também foram excluídos estudos duplicados, com texto completo indisponível, temática diversa ao estudo, e do tipo revisão ou entrevista.

Os estudos foram buscados e avaliados por um único autor, a fim de selecionar aqueles a serem incluídos nesta revisão. A pergunta de pesquisa foi formulada da seguinte maneira:

P – Fibrose Cística

V – Edição com CRISPR.

O – Eficiência da técnica de edição

Alguns dos dados analisados nos estudos foram:

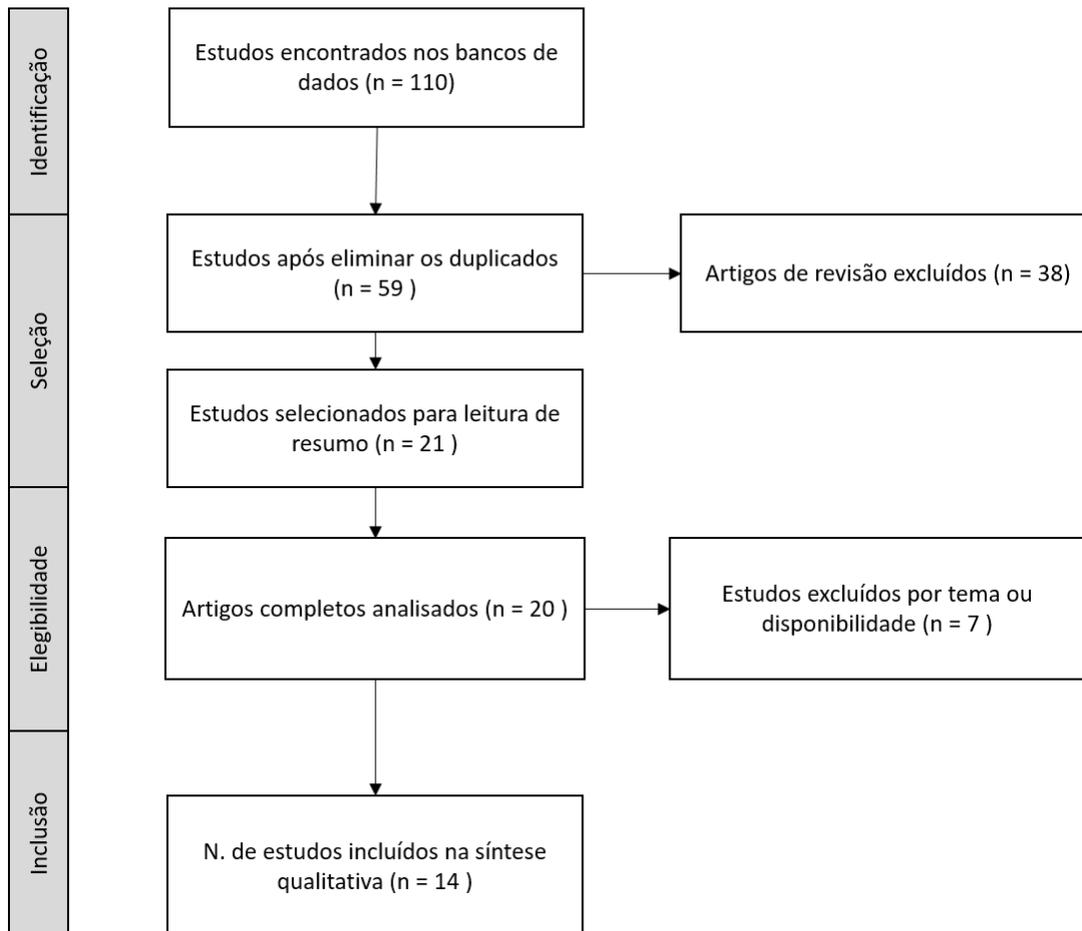
- Ano de publicação, autores, critérios de inclusão e exclusão.
- Metodologia utilizada (vetores, aplicações da técnica)
- Desfecho (recuperação da função da CFTR, efetividade de edição)

Para análise dos desfechos foi avaliado cada método, levando em consideração a amostragem inicial, e a quantidade amostral que foi modificada geneticamente, considerando eventos positivos e negativos de cada processo.

RESULTADOS

Inicialmente foram encontrados 110 estudos, destes 51 foram removidos por estarem em duplicidade nos portais de pesquisa utilizados, e destes, após o emprego de elegibilidade e inclusão, foram selecionados 14 para compor a versão final dessa revisão. A seleção dos estudos seguiu o fluxograma apresentado na Figura 1.

Figura 1. Fluxograma da seleção dos estudos após pesquisa nas bases de dados.



MODELOS *IN VIVO*

Objetivando analisar a resposta à terapia medicamentosa, o desenvolvimento de modelos animais é uma área extremamente importante. No contexto da FC, foram criados modelos murinos com a mutação G542X^{10,15}, a mutação *nonsense* mais frequente entre os pacientes com FC¹⁶, e em seguida foram testadas terapias a fim de observar a resposta nos modelos propostos. A eficácia de edição realizada nos animais dos estudos foi avaliada levando em consideração a obtenção de genótipos homocigotos e heterocigotos após a aplicação da técnica.

McHugh et al. (2018)¹⁰ verificaram que 40,9% dos embriões de rato editados tinham pelo menos 1 alelo mutado, outros 22,7% apresentaram outras mutações provenientes do sistema de reparo celular intrínseco, a união de extremidades não-homólogas (no inglês: *non-homologous end*

joining - NHEJ), e 34,4% permaneceram sem mutações. Ao utilizar Geneticin (G418) em um organóide intestinal coletado dos ratos editados, McHugh et al. (2018) observaram a recuperação de função da proteína CFTR, chegando a 70% da apresentada pelo grupo controle selvagem¹⁰. A G418 é um aminoglicosídeo relacionado à gentamicina, produzido pelo fungo *Micromonospora rhodorangea*. Este antibiótico é rotineiramente usado em pesquisas de laboratório como um agente seletivo para selecionar células geneticamente modificadas. Em relação à fibrose cística, foi observado que a G418 pode suprimir mutações CFTR *nonsense*, ou seja, G542X, R553X e W1282X, suprimindo seu sinal de parada prematura. Isso leva à expressão da proteína CFTR de comprimento total na membrana celular.

Já o estudo de Sharma et al. (2020)¹⁵ comparou a ação de outro antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, a amicacina (aminoglicosídeo semissintético derivado da canamicina) e o G418 sobre a proteína CFTR. Os autores obtiveram sucesso em editar 15 dos 42 ratos genotipados (35,7%) inserindo a mutação G542X, entretanto ao sequenciar as 15 amostras mutadas, apenas 3 apresentaram o genótipo homozigoto para a mutação G542X, os outros animais apresentavam outras mutações concomitantes. Durante os testes com amicacina, tanto no modelo *in vivo* quanto no modelo *in vitro* (células epiteliais da traquéia de ratos) os resultados não demonstraram melhora na ação da proteína CFTR, entretanto ao utilizar G418, no modelo *in vitro* observou-se uma melhora estatisticamente significativa, mas ainda tímida, de 3% na ação da CFTR do grupo mutado em relação ao controle.

Além destes modelos murinos, outro estudo foi desenvolvido com modelos ovinos com genótipos homozigotos para as mutações F508del e G542X¹⁰, e este se propôs a testar a resposta celular frente a terapias medicamentosas já existentes. Utilizando uma cultura de células do epitélio traqueal das ovelhas com a mutação F508del foram testadas as alternativas medicamentosas da empresa Vertex Pharmaceuticals, sendo os medicamentos Tezacaftor (VX-661), Lumacaftor

(VX-809), Elexacaftor (VX-445) e Ivacaftor (VX-770) os alvos desses testes. Todos promoveram aumento funcional da proteína CFTR, entretanto a ativação mais positiva ocorreu sob tratamento com a combinação simultânea de VX-445 e VX-661, seguida de VX-770. Em uma cultura de células com a mutação G542X foram testados o G418 e um inibidor da degradação mediada por mutação sem sentido (SMG1-i), e ambos apresentaram restauração moderada da função da proteína CFTR.

MODELOS *IN VITRO*

Seguindo o mesmo princípio dos modelos *in vivo*, alguns estudos buscaram sistemas de edição baseados na tecnologia CRISPR, para inserir mutações em linhagens de células a fim de criar ferramentas para triagem de novos agentes terapêuticos.

No primeiro estudo, foi avaliado o uso da tecnologia CRISPR para inserir a mutação F508del em uma linhagem celular de leucemia promielocítica (HL-60). Como a FC desencadeia processos inflamatórios e infecções bacterianas crônicas, a avaliação da importância dos neutrófilos na sua fisiopatologia seria de grande valor no entendimento da doença. Tendo isso em vista, Jennings, Ng, and Wang (2019)¹⁷ inseriram a mutação F508del em HL-60, a partir da qual um ilimitado número de neutrófilos com FC poderia se diferenciar. De um total de 27 clones, foram obtidos 50% de heterozigotos e 18,5% de homozigotos. Estes apresentaram deficiência de CFTR e atividade antimicrobiana comprometida - mesmo fenótipo observado em neutrófilos de pacientes fibrocísticos¹⁷. Nesse estudo não foram testadas terapias.

As técnicas baseadas em CRISPR também podem ajudar na validação de outras ferramentas, como o protocolo modificado de reprogramação condicional de células (Mod CRC) sugerido por Peters-Hall et al. (2018)¹⁸. O modelo viabiliza a manutenção da capacidade de

diferenciação multipotente em células basais brônquicas humanas (HBEC) a longo prazo, e principalmente, do funcionamento da proteína CFTR. Foram introduzidas mutações no éxon 11 do gene CFTR, obtendo-se 25% de edição em pelo menos 1 alelo, entretanto, segundo os autores não foi possível identificar deleções menores nas amostras de PCR provenientes dos clones triados, podendo a eficiência do método ser maior do que a observada. O medicamento Ivacaftor foi utilizado nessas HBECs e mostrou-se efetivo na recuperação da funcionalidade celular quando comparado com o grupo controle.

Um estudo desenvolvido em 2017 empregou a tecnologia do CRISPR para avaliar a eficácia de um medicamento disponível no mercado, o Orkambi®, para tratar uma mutação rara de FC, a c.3700A>G. Esta mutação missense (p. Ile1234Val) ocorre no gene da proteína reguladora da condutância transmembrana na fibrose cística (CFTR). Molinski et al. (2017)¹⁹ empregaram a técnica CRISPR sobre uma linhagem de células epiteliais brônquicas (16HBE) para editar o gene CFTR e gerar a mutação c.3700A>G. As células de 16HBE editadas, foram expostas ao Orkambi® juntamente com a pequena molécula amplificadora (PTI-CH). O Orkambi® é uma combinação de Lumacaftor e Ivacaftor, onde o Lumacaftor aumenta a quantidade de proteína na superfície celular ao direcionar a proteína CFTR F508del defeituosa. Já o Ivacaftor aumenta a função da proteína CFTR assim que atinge a superfície celular. Os resultados do estudo demonstraram um aumento na expressão de CFTR, devido a uma maior estabilidade do mRNA promovida pelo fármaco. Além dessa linhagem editada, foram utilizadas células primárias de tecido epitelial nasal, que responderam de modo semelhante ao tratamento. Os resultados alcançados ao utilizar exclusivamente o medicamento revelaram recuperação funcional de apenas 50% da que foi observada em culturas nasais de pacientes com a mutação F508del em estudos passados.

Receptores presentes na membrana celular também podem ser alvos de edição por CRISPR, como no estudo de Hamilton et al. (2019)²⁰, em que foi realizado o *knockout* do gene

receptor do adenovírus (do inglês: *adeno-associated virus receptor*- AAVR) em células do epitélio das vias aéreas, a fim de localizar e analisar a influência desse receptor na transdução do vírus adeno-associado (do inglês: *adeno-associated virus*- AAV). Como principais achados, o artigo relata o bloqueio da infecção pelo AVV tipo 2 (AAV2) nas células que sofreram o *knockout* do AAVR, mas o mesmo não ocorreu com AAV2.5T, uma quimera altamente infecciosa de AAV2 e AAV5 com a mutação pontual A581T. Os autores sugerem que a transdução por AAV2.5T ocorre independente do AAVR, encontrado basolateralmente na membrana, sendo efetuada por um receptor apical.

ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

Além das aplicações já citadas, a tecnologia CRISPR já vem sendo estudada como alternativa terapêutica, e alguns desses estudos já demonstram a viabilidade de terapias de edição genética²¹. No quadro 1, estão sumarizados os dados encontrados em estudos recentes, que utilizaram tecnologias baseadas em CRISPR a fim de recuperar a funcionalidade celular por meio da correção de mutações ou ativação da proteína CFTR. Nesses estudos, foram testadas algumas variáveis do processo de edição com a finalidade de verificar a viabilidade de tratar tecidos com genótipo mutado para FC. Os resultados obtidos foram promissores, e alguns conseguiram recuperação da função da CFTR maiores que o limiar de 15%, dito na literatura como sendo capaz de promover a normalização da função tecidual, tornando-a muito similar à observada em portadores assintomáticos da doença²².

Quadro 1. Estudos recentes (últimos 3 anos) sobre CRISPR como ferramenta terapêutica de FC.

Autor (Ano)	Tecido Alvo	Mutações	Principais resultados
Maule et al. (2019) ²³	Organóides intestinais, células primárias de vias aéreas de pacientes com FC, minigene	3272-26A>G (c.3140-26A>G) e 3849+10kbC>T (c.3718-2477C>T)	AsCas12a em combinação com um RNA guia de fita simples gera deleções na região <i>upstream</i> da mutação 3272-26A>G em um modelo de minigene, recuperando eficientemente o defeito de <i>splicing</i> da FC.
Vaidyanathan et al. (2021) ²²	Células-tronco basais das vias aéreas superiores e células epiteliais brônquicas humanas	F508del, W1282X, R553X e 3659delC	O estudo indica que a estratégia universal pode restaurar a função da CFTR ficou bem além do limiar de 15%, e permite a restauração da função da CFTR a níveis observados em pacientes portadores de FC assintomáticos.
Ruan et al. (2019) ²¹	Células-tronco pluripotentes, linhagem de células de adenocarcinoma (CFPAC-1)	F508del, G542X e G551D	Esse trabalho mostra que os locais das principais mutações causadoras de FC podem ser editados com eficiência, frequentemente maior que 10%, em células com relevância clínica utilizando eletroporação de Cas9 RNP
Vaidyanathan et al. (2020) ²⁴	Células-tronco basais das vias aéreas de pacientes com FC	F508del	O estudo mostra que o sistema que consiste em Cas9, MS-sgRNA, e AAV6 pode ser usado para corrigir a mutação F508del em células tronco/progenitoras primárias das vias aéreas obtidas de pacientes com FC.

Zhou et al. (2019) ²⁵	Cultura de células suínas	DSB (do inglês: <i>double strand break</i>) em região <i>upstream</i> do start códon do CFTR	Os resultados mostraram a integração precisa entre vetor HD-Ad e hCFTR no locus GGTA1 através da HDR (do inglês: <i>homology directed repair</i>) induzida por CRISPR/Cas9; expressão <i>in vitro</i> funcional de longo prazo foi alcançada em células transduzidas
Xia et al. (2018) ²⁶	Linhagem celular de FC (IB3-1).	F508del/W1282X	Esse estudo fornece provas de que vetores HD-Ad podem ser usados para entregar com sucesso as ferramentas de edição genética em lugares específicos, sem deixar material genético indesejado residual.
Villamizar et al. (2019) ²⁷	Cultura de células nasais	F508del	Essa observação sugere que CRISPR/dCas-VPR e BGAS-gapmer podem marcar e ativar especificamente a CFTR.

Maule et al. (2019)²³ adotaram uma metodologia que compreendia o uso da nuclease AsCas12a adicionada de uma fita guia de CRISPR RNA (crRNA) para corrigir mutações patogênicas de classe V, que resultam em quantidade insuficiente da proteína CFTR normal presente na superfície celular. Para efeitos de comparação, em testes paralelos, foi empregada uma das primeiras nucleases descobertas, a Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), em associação com uma fita simples de RNA guia. Primeiramente, o estudo utilizou um modelo de minigene que compreendia parte do exon 18, exons 19 e 20 inteiros, e o intron 19, com a mutação 3272-26A>G, e outro com genótipo selvagem. A SpCas9 realizou as deleções esperadas no DNA, em contrapartida a AsCas12a, que não foi capaz de reparar o problema no *splicing*. Entretanto, ao proceder com os testes em células HEK293 (linhagem de células de rim embrionárias humanas) transfectadas com o minigene mutado, o resultado foi o oposto: todas as tentativas com SpCas9 falharam em corrigir o defeito de *splicing*, ao passo que a AsCas12a teve como resultado 68% dos eventos (deleções de diversos tamanhos) culminando em restauração do *splicing* normal. Ainda nesse estudo, foram utilizadas células epiteliais de vias aéreas e organóides intestinais, cujos resultados foram tão positivos quanto os observados nas células HEK293. Os mesmos testes foram reproduzidos para o genótipo heterozigoto F508del/3849+10kbC>T, nos quais foi verificada a precisão da técnica pela ausência de clivagens fora do local designado ou em outros alelos.

O estudo de Vaidyanathan et al. (2021)²² avaliou a possibilidade de inserir o cDNA completo do CFTR nas células com FC, e para isso foram adotados 2 vetores AAV carregando a metade do cDNA cada um, a enzima Cas9, responsável pela quebra da dupla fita de DNA, e *homology arms* (HA) para direcionar o cDNA no reparo por recombinação homóloga, consequência da quebra do DNA. Os autores aplicaram essa estratégia de edição sobre células-tronco basais das vias aéreas superiores e células epiteliais brônquicas humanas, que portavam diferentes mutações, e

observaram que a restauração do funcionamento da CFTR chegava, em média, a 70% dos níveis constatados no grupo controle não fibrocístico.

As diversas variáveis que envolvem a aplicação do CRISPR, permitem combinações de diferentes formas de entrega dos seus componentes para dentro do ambiente celular com diferentes conformações desses mesmos componentes. Para comparar métodos de transfecção não virais (eletroporação e lipofectamina) e conformações dos elementos de CRISPR (plasmídeo e ribonucleoproteína - RNP), Ruan et al. (2019)²¹ utilizaram uma linhagem de células-tronco pluripotentes selvagens, que foram induzidas a expressar as mutações F508del, G542X e G551D. Durante os estudos, o método de maior eficiência foi a eletroporação de RNP de CRISPR/Cas9 com RNA guia, apresentando 4,7% a 27,2% de sucesso nas edições. Também foi utilizada uma linhagem celular de pacientes com a mutação F508del, a qual foi submetida ao mesmo método citado anteriormente, e revelou mais de 20% de sucesso ao corrigir as mutações precisamente.

Não somente com vistas para terapias *in vivo*, um dos estudos encontrados abre caminhos para potenciais transplantes autólogos com células geneticamente corrigidas²⁴. Nesse estudo, células-tronco basais das vias aéreas superiores e células do epitélio brônquico provenientes de 10 pacientes fibrocísticos foram editadas com Cas9 e AAV tipo 6, alcançando, em média, de 30% a 50% de correção dos alelos mutados, e como reflexo dessa edição, apresentaram de 20% a 50% da função da CFTR do controle não fibrocístico em epitélio diferenciado.

Como alternativa aos AAV já usados por outras pesquisas, Zhou et al. (2019)²⁵ desenvolveram um vetor de adenovírus dependente de ajuda (do inglês: *helper dependant adenovirus* - HD-Ad), que se apresentou como alternativa viável no processo de transfecção dos componentes do CRISPR. Esse mesmo tipo de vetor, o HD-Ad, foi avaliado no trabalho de Xia et al. (2018)²⁶, que por sua vez, observou como vantagem o fato de, após a transfecção, não haver

material genético residual que pudesse promover a expressão de Cas9, pois essa expressão poderia levar o sistema imunológico a eliminar as células com os genes editados.

Em um caminho diferente, Villamizar et al. (2019)²⁷ propõem uma terapia baseada na ativação do gene CFTR, sem corrigir o genótipo do tecido alvo. Composto de um ativador tripartite (VP64-p65-Rta) e da proteína Cas9 modificada (sem a capacidade de clivar), esse ativador promoveu o aumento de expressão e função do CFTR em um tecido de epitélio nasal de pacientes com a mutação F508del. Ainda nesse estudo foram utilizados exossomos e nanopartículas lipídicas carregando o peptídeo de penetração de células HIV-Tat, cujos resultados também foram positivos quanto a recuperação da função e expressão do CFTR.

CONCLUSÃO

A versatilidade do CRISPR é inegável, sendo observada nas diversas aplicações relatadas nessa revisão, tanto como ferramenta para criação de modelos animais quanto corretivo para mutações que causam a FC. Entretanto, os desafios existentes na sua aplicação ainda são impeditivos quando se trata de uso clínico. Um dos desafios da aplicação do CRISPR como alternativa terapêutica para a FC é que essa doença possui caráter sistêmico, o que dificulta o estabelecimento de metodologias adequadas para aplicação da técnica em pacientes. Em decorrência disso, alguns estudos optam por trabalhar apenas com desfechos parciais, utilizando como parâmetro a melhora da função da proteína CFTR em um tecido específico, mesmo quando são utilizados modelos animais. Ainda, outra preocupação são as edições *off-target*, que acontecem em decorrência da imprecisão da técnica e dos mecanismos de recuperação da própria célula, e podem comprometer a eficiência da edição desejada. Ainda que o CRISPR tenha se mostrado uma

opção muito mais precisa que as demais alternativas conhecidas até o momento, melhoramentos são necessários a fim de obter resultados mais consistentes no processo de edição.

Os vetores também são abordados nesses estudos, e por serem os responsáveis pela veiculação dos componentes do CRISPR assumem papel crucial nesse processo, sendo preciso entender como eles interagem com seus receptores, e como é possível lidar com a imunogenicidade própria de cada um. Portanto, pode-se observar nesse estudo a evolução alcançada pela pesquisa com a técnica de CRISPR no contexto da FC, bem como o surgimento de novos instrumentos de pesquisa, e as barreiras a serem transpostas por estudos futuros.

CONFLITOS DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. O'neal WK, Knowles MR. Cystic fibrosis disease modifiers: complex genetics defines the phenotypic diversity in a monogenic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* [Internet]. 2018 [cited 2021 Oct 27]; Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083117-021329>
2. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2012 Dec 20 [cited 2021 Oct 27];173(5):475–82. Available from: <https://doi.org/10.1164/rccm.200505-840OE>
3. Matos BA, Martins RC. Fibrose cística: uma revisão de literatura. *Braz. J. Surg. Clin.* 2019 [cited 2021 Nov 8];29(2):114-119. Available from: https://www.mastereditora.com.br/periodico/20200105_095238.pdf

4. Vendrusculo FM, Donadio MVF, Pinto LA. Cystic fibrosis in Brazil: achievements in survival. *J Bras Pneumol*. 2021 [cited 2021 Nov 8];47(2):e20210140. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33950101/>
5. Zeitlin PL. Emerging drug treatments for cystic fibrosis. *Expert Opin Emerg Drugs* [Internet]. 2007 May [cited 2021 Oct 27];12(2):329–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17604505/>
6. Middleton PG, Mall MA, Dřevínek P, Lands LC, McKone EF, Polineni D, et al. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for cystic fibrosis with a single Phe508del allele. *NEJM* [Internet]. 2019 Nov 7 [cited 2021 Oct 27];381(19):1809–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31697873/>
7. Villamizar O, Waters SA, Scott T, Grepo N, Jaffe A, Morris KV. Mesenchymal stem cell exosome delivered zinc finger protein activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Extracell. Vesicles* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Oct 27];10(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33532041/>
8. Schwank G, Koo B-K, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2013 Dec 5 [cited 2021 Oct 27];13(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24315439/>
9. Xu Y, Li Z. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Oct 27];18:2401–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33005303/>

10. McHugh DR, Steele MS, Valerio DM, Miron A, Mann RJ, LePage DF, et al. A G542X cystic fibrosis mouse model for examining nonsense mutation directed therapies. *PLoS One*[Internet]. 2018 [cited 2021 Oct 27];13(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29924856/>
11. Viotti Perisse I, Fan Z, Van Wettere A, Liu Y, Leir S-H, Keim J, et al. Sheep models of F508del and G542X cystic fibrosis mutations show cellular responses to human therapeutics. *FASEB BioAdva* [Internet]. 2021 Oct [cited 2021 Oct 27];3(10). 3(10):841-854 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8493969/>
12. McCarron A, Cmielewski P, Reyne N, McIntyre C, Finnie J, Craig F, et al. Phenotypic characterization and comparison of cystic fibrosis rat models generated using CRISPR/Cas9 Gene editing. *Am J Pathol* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 Oct 27];190(5):977–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32084371/>
13. Firth AL, Menon T, Parker GS, Qualls SJ, Lewis BM, Ke E, et al. Functional gene correction for cystic fibrosis in lung epithelial cells generated from patient iPSCs. *Cell Rep*. [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2021 Oct 27];12(9):1385–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26299960/>
14. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group TP. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Med* [Internet]. 2009 Jul [cited 2021 Oct 25];6(7):e1000097. Available from: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1000097>

15. Sharma J, Abbott J, Klaskala L, Zhao G, Birket SE, Rowe SM. A Novel G542X CFTR Rat model of cystic fibrosis is sensitive to nonsense mediated decay. *Front. Physiol.* [Internet]. 2020 Dec 16 [cited 2021 Oct 27];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33391025/>
16. Gambari R, Breveglieri G, Salvatori F, Alessia Finotti, Borgatti M. Therapy for cystic fibrosis caused by nonsense mutations. *Cystic Fibrosis in the Light of New Research*, Dennis Wat, IntechOpen. 2015 Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/48897>
17. Jennings S, Ng HP, Wang G. Establishment of a $\Delta F508$ -CF promyelocytic cell line for cystic fibrosis research and drug screening. *J Cyst Fibros* [Internet]. 2019 [cited 2021 Oct 27];18(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30670178/>
16. Peters-Hall JR, Coquelin ML, Torres MJ, LaRanger R, Alabi BR, Sho S, et al. Long-term culture and cloning of primary human bronchial basal cells that maintain multipotent differentiation capacity and CFTR channel function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Oct 28];315(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29722564/>
19. Molinski S v, Ahmadi S, Ip W, Ouyang H, Vilella A, Miller JP, et al. Orkambi® and amplifier co-therapy improves function from a rare CFTR mutation in gene-edited cells and patient tissue. *EMBO Mol. Med.* [Internet]. 2017 [cited 2021 Oct 27];9(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28667089/>
20. Hamilton BA, Li X, Pezzulo AA, Abou Alaiwa MH, Zabner J. Polarized AAVR expression determines infectivity by AAV gene therapy vectors. *Gene Ther* [Internet]. 2019 Jun [cited 2021 Nov 8];26(6):240-249. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30962536/>

21. Ruan J, Hirai H, Yang D, Ma L, Hou X, Jiang H, et al. Efficient gene editing at major CFTR mutation loci. *Mol. Ther. Nucleic. Acids* [Internet]. 2019 Jun [cited 2021 Oct 28] 7;16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30852378/>
22. Vaidyanathan S, Baik R, Chen L, Bravo DT, Suarez CJ, Abazari SM, et al. Targeted replacement of full-length CFTR in human airway stem cells by CRISPR-Cas9 for pan-mutation correction in the endogenous locus. *Mol. Ther.* [Internet]. 2021 Mar 29 [cited 2021 Oct 28]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33794364/>
23. Maule G, Casini A, Montagna C, Ramalho AS, de Boeck K, Debyser Z, et al. Allele specific repair of splicing mutations in cystic fibrosis through AsCas12a genome editing. *Nat. Commun.* [Internet]. 2019 [cited 2021 Oct 29];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31391465/>
24. Vaidyanathan S, Salahudeen AA, Sellers ZM, Bravo DT, Choi SS, Batish A, et al. High-efficiency, selection-free gene repair in airway stem cells from cystic fibrosis patients rescues cftr function in differentiated epithelia. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2020 [cited 2021 Oct 29];26(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31839569/>
25. Zhou ZP, Yang LL, Cao H, Chen ZR, Zhang Y, Wen X-Y, et al. In Vitro validation of a CRISPR-mediated CFTR correction strategy for preclinical translation in pigs. *Hum. Gene Ther.*[Internet]. 2019 [cited 2021 Oct 29];30(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31099266/>
26. Xia E, Duan R, Shi F, Seigel KE, Grasemann H, Hu J. Overcoming the undesirable crispr-cas9 expression in gene correction. *Mol. Ther. Nucleic. Acids* [Internet]. 2018 Dec 7 [cited 2021 Oct 29];13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30513454/>

27. Villamizar O, Waters SA, Scott T, Saayman S, Grepo N, Urak R, et al. Targeted activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol. Ther.* [Internet]. 2019 [cited 2021 Oct 29];27(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31383454/>
28. McHugh DR, Steele MS, Valerio DM, Miron A, Mann RJ, LePage DF, et al. A G542X cystic fibrosis mouse model for examining nonsense mutation directed therapies. *PLoS One* [Internet]. 2018 Jun 20 [cited 2021 Nov 8];13(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29924856/>