

Eu, Frederico de Brito Nunes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2008011363, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 18 de julho de 2014.

Assinatura: \_\_\_\_\_

(Frederico de Brito Nunes)

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**Monografia**

**Novas estratégias de reparação génica**

Ano letivo 2013/2014

Tutor:

---

(Professor Doutor Luís Almeida)

Estudante:

---

(Frederico de Brito Nunes)

## **Agradecimentos**

Ao meu tutor, o Professor Doutor Luís Almeida, agradeço toda a ajuda e apoio prestados durante a elaboração desta monografia.

A todos os amigos e amizades que criei ao longo destes 6 anos, em especial ao Adelino, à Ana Teresa, ao Gil, à Sara e ao Tony, um obrigado por estarem sempre presentes e me acompanharem nesta longa viagem.

À Rita, que apareceu sem avisar na minha vida e por todo o carinho e apoio nos últimos meses.

À Quica, pelos 17 anos de apoio incondicional.

À minha Mãe, que muito sacrificou para eu ter a melhor educação possível e sempre acreditou que eu posso fazer e ser mais e melhor.

A Coimbra, cidade do meu coração, por tudo!

## **Índice**

Índice de figuras.....	5
Índice de tabelas.....	5
1. Abreviaturas.....	6
2. Resumo/Abstract.....	7
2.1. Resumo.....	7
2.2. Abstract.....	7
3. Introdução.....	8
3.1. Engenharia Genética.....	8
3.2. Mecanismos de reparação de DNA.....	9
4. Tecnologias de EG.....	11
4.1. <i>Zinc Fingers</i> .....	11
4.2. TALEN.....	13
4.3. CRISPR/Cas.....	15
5. Aplicações terapêuticas.....	18
5.1. ZFN.....	19
5.2. TALEN.....	20
5.3. CRISPR/Cas.....	21
6. Barreiras a ultrapassar.....	22
7. Conclusão.....	24
8. Bibliografia.....	26

## **Índice de figuras**

Figura 1 – A evolução dos métodos de EG.....	8
Figura 2 – Esquema da NHEJ.....	10
Figura 3 – Esquema da RH.....	11
Figura 4 – Estrutura dum ZF.....	12
Figura 5 – Esquema dum par de ZFNs ligados ao DNA.....	13
Figura 6 – Reconhecimento do DNA pela TALE.....	14
Figura 7 – Funcionamento do sistema CRISPR/Cas tipo II em bactérias.....	16
Figura 8 – Aplicações da Cas.....	17
Figura 9 – Aplicações terapêuticas.....	21

## **Índice de tabelas**

Tabela 1 – Ensaio clínico em curso.....	19
Tabela 2 - Estudos pré-clínicos em modelos de doença.....	20
Tabela 3 - Organismos modificados por EG.....	22

## **I. Abreviaturas**

Cas – Proteínas Associadas ao CRISPR

CCR5 - recetor da quimiocina C-C tipo 5

CoDA – Montagem dependente do contexto

CRISPR - Conjunto de Pequenas Repetições Palindrómicas Regularmente Espaçadas

crRNA – CRISPR RNA

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSB – Clivagem da dupla cadeia

dsDNA – DNA de dupla cadeia

EG – Engenharia genética

NHEJ - Junção Não Homóloga das Extremidades

NLS - Sinal de Localização Nuclear

OPEN - *Oligomer Pool Engineering*

PAM - Sequência Motivo Adjacente ao Proto-espaçador

RH – Recombinação Homóloga

RVD - Di-resíduos Variáveis da Repetição

sgRNA – RNA guia

SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Humana

ssDNA – DNA de cadeia simples

TALE - Efectora Similar a Ativadores da Transcrição

TALEN - Nuclease Efectora Similar a Ativadores da Transcrição

tracrRNA – crRNA de trans-ativação

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

ZF – *Zinc Finger*

ZFN – Nuclease *Zinc Finger*

## **2. Resumo/Abstract**

### **2.1. Resumo**

A capacidade de modificar o genoma com precisão – engenharia genética (EG) – constitui uma das mais promissoras tecnologias no campo da biotecnologia e marca um avanço no que diz respeito à terapia génica. Através do uso de nucleases quiméricas direcionadas para determinada sequência genética, será possível o tratamento de várias doenças de origem genética. Nesta monografia, irei dar uma visão geral sobre as tecnologias utilizadas em EG: as nucleases *Zinc Finger* (ZFN), as nucleases Efectoras Similares a Activadores da Transcrição (TALEN) e as nucleases baseadas no sistema bacteriano do conjunto de pequenas repetições palindrómicas regularmente espaçadas (CRISPR). Irei também analisar as possíveis aplicações terapêuticas destes métodos, assim como as limitações ainda existentes e que necessitam de ser ultrapassadas, de modo a que a aplicação destas tecnologias na medicina seja possível num futuro próximo.

### **2.2. Abstract**

The ability to precisely alter the genome – genome engineering – is one of the most promising technologies in the field of biotechnology and establishes a step up in the field of genetic therapy. With the use of targeted quimeric nucleases to a determined genetic sequence, it will be possible to treat genetic diseases. Here, I provide an overview of the genome engineering technologies: the Zinc Finger Nucleases (ZFN), the Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN), and the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) based nucleases. I also discuss the possible therapeutic applications of these methods, as well as its limitations, which need to be dealt with in order to employ these technologies in medicine in the near future.

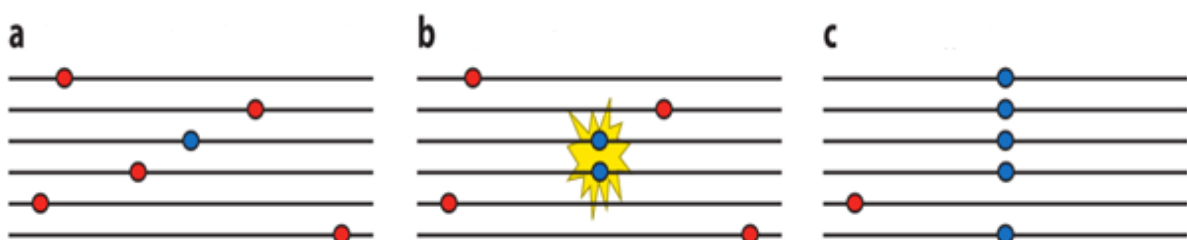
### 3. Introdução

#### 3.1. Engenharia Genética

O Prémio Nobel da Medicina de 2007 reconheceu os feitos de Capecchi, Smithies e Evans pelo desenvolvimento de métodos que criam alterações localizadas no genoma de murganhos. Esses métodos levaram a que o murganho se tornasse o modelo genético de eleição para doenças humanas. O impacto destes métodos no conhecimento da função genética e no desenvolvimento de novas terapêuticas é incalculável. Contudo, estamos no início duma era em que se espera que as novas técnicas de engenharia genética e genómica (EG) venham a ter um impacto muito superior (SEGAL and MECKLER, 2013).

A EG refere-se à capacidade de manipular com precisão genomas complexos, tendo diversas aplicações ao nível da biotecnologia e da terapia génica (MUSSOLINO and CATHOMEN, 2012), como a correção de doenças genéticas, tendo em perspetiva a terapia celular personalizada (LI *et al.*, 2014).

Os métodos clássicos de EG podem ser categorizados em mutagénesse aleatória com seleção (Figura 1a) e direcionamento parcial com seleção (Figura 1b). Na mutagénesse aleatória usa-se radiação, químicos ou transposões para gerar mutações aleatórias no genoma, que depois é rastreado para detetar a existência de mutações no local desejado (SEGAL and MECKLER, 2013). No direcionamento parcial com seleção utilizam-se várias cópias duma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) exógena com uma cassette de inserção, flanqueadas por regiões homólogas ao local do genoma onde esta vai ser inserida através de mecanismos de reparação do DNA. Este método pode ser associado a técnicas de seleção que permitem contabilizar quantas vezes ocorreu a mutação desejada (CAPECCHI, 2005). Estes métodos são ineficazes porque muitas alterações do genoma ocorrem fora do local desejado e a frequência de mutações desejadas é baixa, o que leva à necessidade de tratamento duma população extensa (SEGAL and MECKLER, 2013).



**Figura 1** – A evolução dos métodos de EG: a) mutagénesse aleatória com seleção; b) direcionamento parcial com seleção; c) direcionamento real. Cada linha representa o genoma duma célula tratada. Os pontos azuis indicam modificações genéticas no local desejado. Os pontos vermelhos indicam modificações genéticas fora do local desejado. A mancha amarela na imagem b) indica que alguns dos genomas que foram modificados corretamente podem ser identificados por marcadores seletivos (adaptada de SEGAL and MECKLER, 2013).



Os métodos atualmente em desenvolvimento baseiam-se no uso de nucleases quiméricas, que são compostas por módulos que se ligam a sequências específicas de DNA e módulos de clivagem de DNA (URNOV *et al.*, 2010). Estas conseguem modificações genéticas eficazes e precisas através da indução de clivagens em locais específicos previamente selecionados na dupla cadeia de DNA, estimulando assim os mecanismos celulares de reparação do DNA. Este método caminha para o que se considera de direcionamento real (Figura 1c) (SEGAL and MECKLER, 2013).

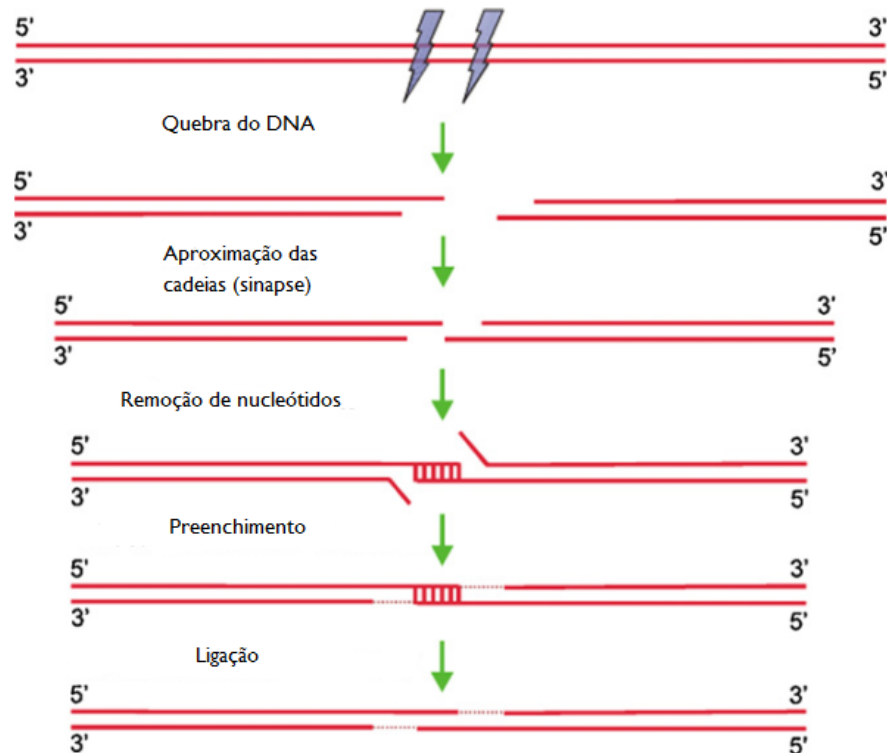
Os protótipos destas enzimas eram formados por nucleases *I-SceI* e HO, cujos locais de ligação ao DNA são longos (18 pb e 24 pb, respetivamente). Embora tenham fornecido informação útil sobre a eficácia dos mecanismos de reparação de clivagens de dupla cadeia de DNA (*double strand breaks* - DSB), o seu uso era limitado porque os locais de reconhecimento de DNA tinham de ser inseridos no genoma, processo esse pouco eficiente. Era necessário arranjar moléculas que conseguissem ligar-se a sequências do genoma pré-existentes (CARROLL, 2011).

Os esforços realizados resultaram na descoberta das nucleases *Zinc Finger* (ZFN), das nucleases Efectoras Similares a Activadores da Transcrição (TALEN) e, mais recentemente, das nucleases baseadas no sistema bacteriano do conjunto de pequenas repetições palindrómicas regularmente espaçadas (CRISPR) (SEGAL and MECKLER, 2013).

### **3.2. Mecanismos de reparação de DNA**

As DSBs são uma forma de danificar o DNA em que ambas as cadeias são clivadas. As duas grandes vias de reparação das DSBs no DNA eucariota são a junção não homóloga das extremidades (NHEJ) e a recombinação homóloga (RH) (SEGAL and MECKLER, 2013).

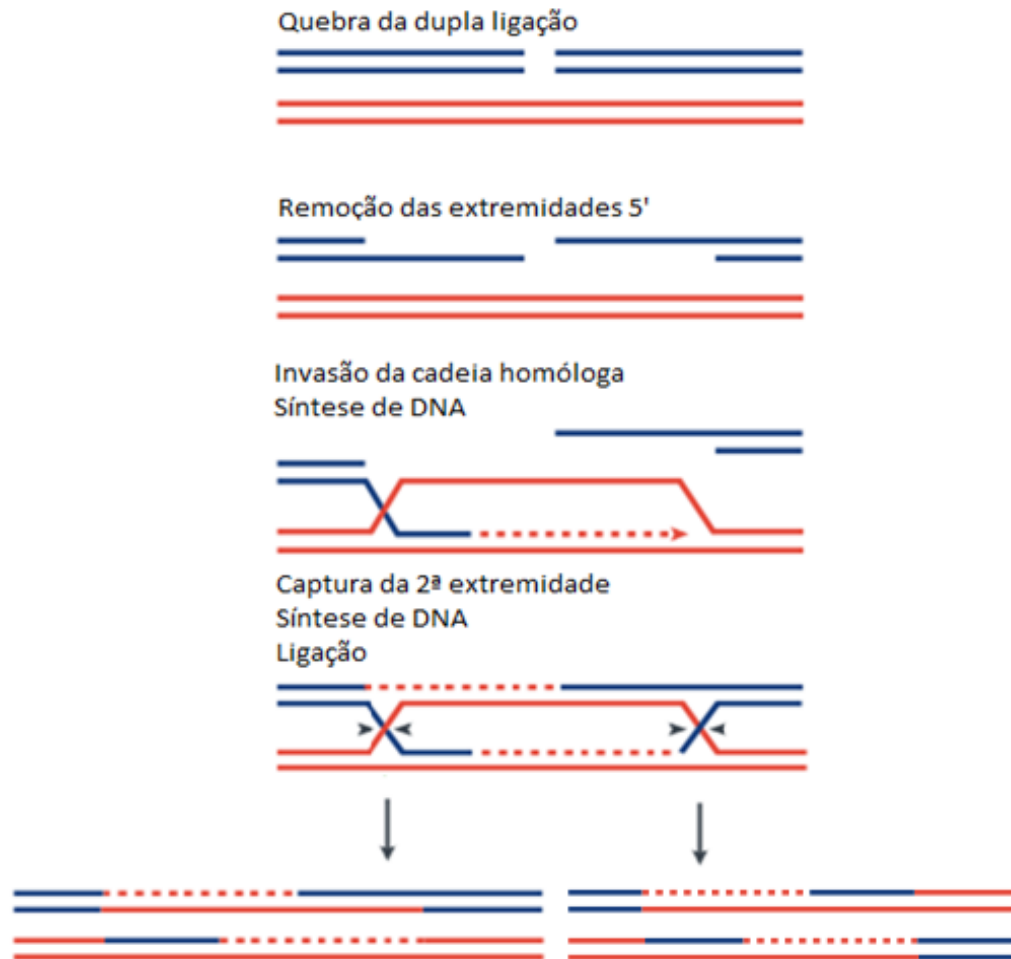
A NHEJ (Figura 2) é um processo que restabelece a ligação das 2 extremidades onde ocorreu a quebra (LIEBER *et al.*, 2010). Esta via é propensa a erros porque não usa um *template* homólogo para a reparação, o que leva a pequenas inserções ou supressões (*indels*) de nucleótidos no local de reparação, o que pode induzir mutações por mudança de enquadramento (*frameshift*) que anulem a função do gene (GAJ, GERSBACH and BARBAS, 2013).



**Figura 2** – Esquema da NHEJ. Após a DSB, há uma aproximação das cadeias para ocorrer o processamento das extremidades. Este processamento ocorre em 3 passos: remoção dos nucleótidos em excesso das extremidades 3', preenchimento dos espaços vazios por uma polimerase de DNA, e ligação das cadeias por uma ligase de DNA (Adaptada de PASTWA *et al.*, 2009)

Já a reparação por recombinação homóloga (RH; Figura 3) corrige a quebra sem erros através da cópia da informação de uma sequência homóloga, como a de um cromatídeo irmão ou de uma molécula dadora inserida na célula. As extremidades do DNA no local da quebra são removidas, deixando terminações 3' que procuram e invadem as sequências homólogas. As terminações são prolongadas no *template*, copiando a sua informação (SEGAL and MECKLER, 2013).

Nas células eucariotas, o NHEJ é normalmente preferido em relação à RH, mas a frequência da última pode ser aumentada se se transferirem para a célula elevadas quantidades da sequência *template* homóloga (LOMBARDO *et al.*, 2007). Quando pretendemos inserir um novo gene no genoma, é desejável que a reparação ocorra por RH.



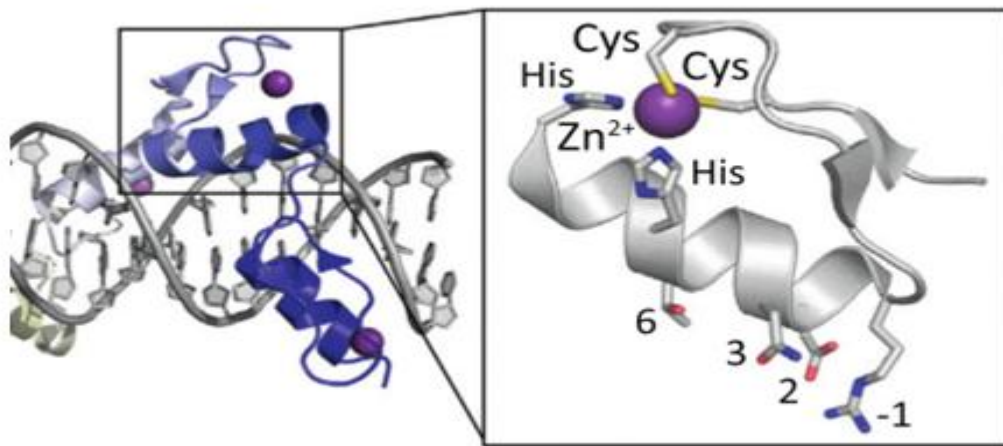
**Figura 3** – Esquema da reparação por recombinação homóloga (RH). Após a quebra das duas cadeias (DSB), há a remoção das extremidades 5'. De seguida, uma das extremidades 3' invade a cadeia homóloga que servirá de *template* para a síntese de DNA. Este processo repete-se com a outra extremidade 3'. Após a reparação da quebra e síntese de DNA, dá-se a ligação das extremidades (Adaptada de SUNG and KLEIN, 2006)

## 4. Tecnologias de EG

### 4.1. Zinc Fingers

As ZFNs são uma das tecnologias de EG desenvolvidas nos últimos anos (CARROLL, 2011). Estas proteínas sintéticas têm origem na observação das atividades de ligação e de clivagem fisicamente separáveis da enzima de restrição *FokI* (LI, WU and CHANDRASEGARAN, 1992). O domínio de clivagem não tem especificidade evidente por nenhuma sequência genética, mas este pode ser redirecionado através da substituição dos domínios de ligação (KIM and CHANDRASEGARAN, 1994). O mais usado destes foi um conjunto de *Zinc Fingers* (ZF) com 2 cisteínas e 2 histidinas ( $Cys_2His_2$ ), em que cada unidade contém cerca de 30 aminoácidos numa configuração  $\beta\beta\alpha$  ligados a um átomo de zinco (Figura 4) (BEERLI and BARBAS, 2002; PAVLETICH and PABO, 1991). Este é um dos motivos ligadores de DNA mais comuns encontrado nos eucariotas e representa o segundo domínio proteico mais codificado no genoma humano (BEERLI and BARBAS, 2002). A

estrutura cristalina demonstra que cada ZF contacta com 3 pb do DNA (PAVLETICH and PABO, 1991).



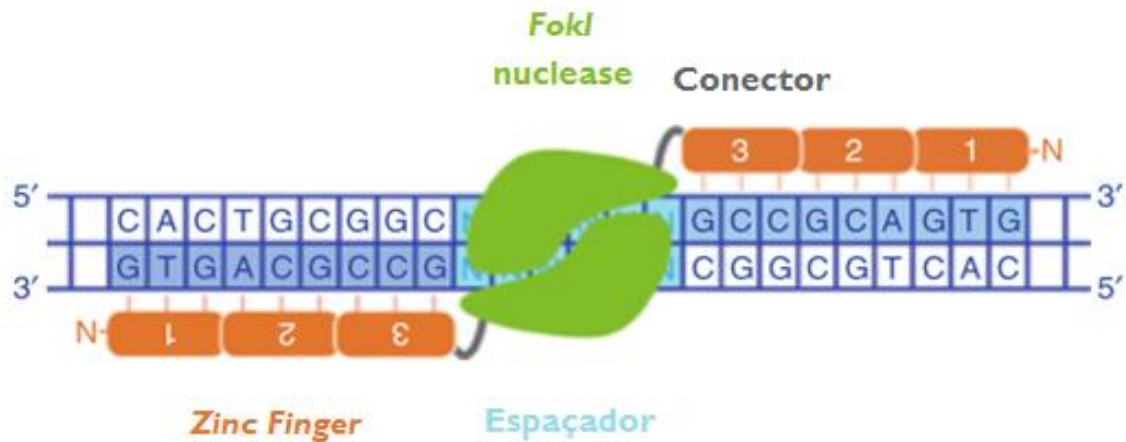
**Figura 4** – Estrutura dum ZF. Proteína ZF (azul) ligada ao DNA alvo (cinzento). Cada ZF consiste em, aproximadamente, 30 aminoácidos num arranjo  $\beta\beta\alpha$ . Os resíduos de superfície (-1, 2, 3 e 6) são os que contactam com o DNA. Cada ZF contacta com 3 ou 4 pb. As cadeias laterais dos resíduos de cisteína e histidina estão em contacto com o íão  $Zn^{2+}$  (roxo) (Adaptada de GAJ, GERSBACH and BARBAS, 2013)

A estrutura modular das proteínas ZF tornou-as numa ferramenta de trabalho atrativa para o design de proteínas que se ligam ao DNA de forma específica. A chave para a sua aplicação no reconhecimento de DNA foi o desenvolvimento de matrizes contendo 3 ou mais ZF. Isto permite o reconhecimento de sequências de DNA com pelo menos 9 pb de comprimento (LIU *et al.*, 1997).

Para clivar, a *FokI* tem que estar dimerizada (BITINAITE *et al.*, 1998). Para tal, é necessário construir 2 conjuntos de ZFs direcionados a lados opostos da sequência alvo, juntar cada um deles ao domínio de clivagem através dum conector e usar um pequeno espaçador (5 ou 6 pb) entre os locais de ligação dos ZFs (Figura 5) (HÄNDEL, ALWIN and CATHOMEN, 2009; SHIMIZU, BHAKTA and SEGAL, 2009). A necessidade de dimerização é uma vantagem porque permite uma maior especificidade, isto é, 2 conjuntos com 3 ZFs cada especificam a localização de 18 pb (9 cada), que é suficiente para escolher um alvo de forma precisa no genoma humano (CARROLL, 2011)

Existem 2 métodos para a construção de proteínas ZF com especificidade única para o DNA. A montagem modular envolve o uso duma biblioteca de módulos de ZFs otimizados individualmente para reconhecer uma sequência de 3 pb específica. Os módulos selecionados podem ser ligados para reconhecer sequências de DNA específicas (BEERLI and BARBAS, 2002; SEGAL *et al.*, 1999). Contudo, o contexto do local onde as ZFs se vão ligar pode reduzir a atividade destes. O método “*oligomer pool engineering*” (OPEN)/montagem

dependente do contexto (CoDA) é bastante similar ao anterior, porém este tem em conta as interações dependentes de contexto entre os ZFs vizinhos e o local de ligação ao DNA (SANDER *et al.*, 2011).



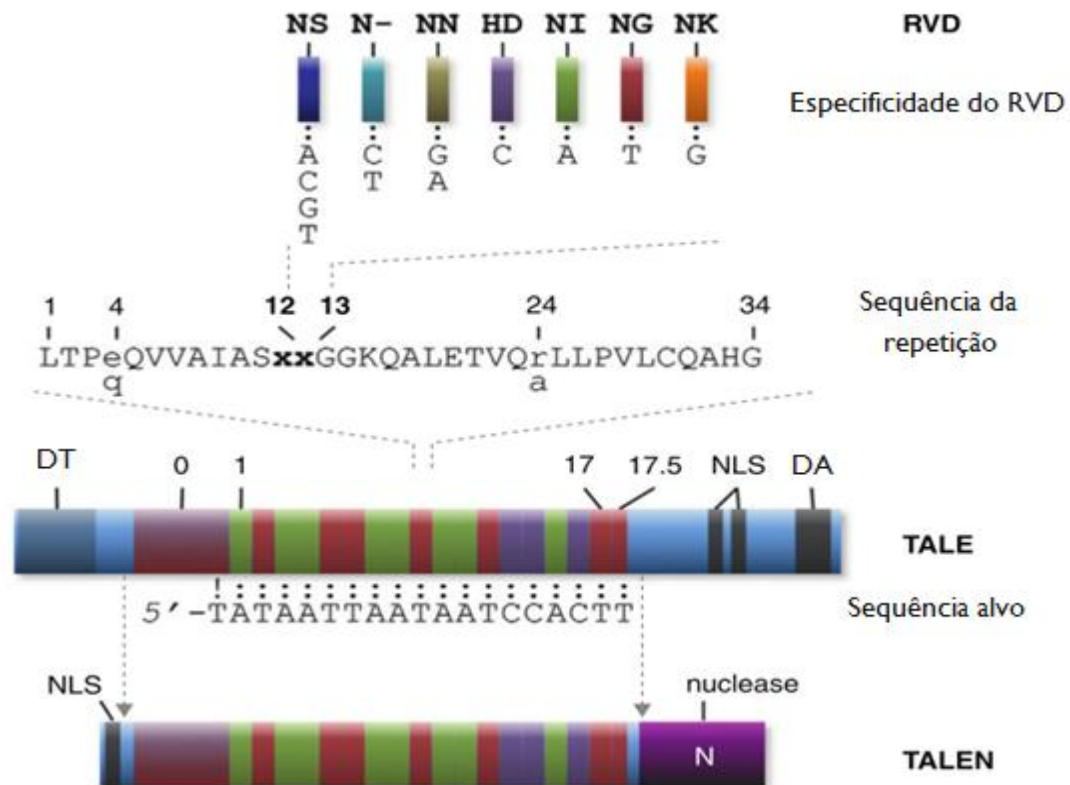
**Figura 5** – Esquema de um par de ZFNs ligados ao DNA. Os alvos das ZFNs consistem em 2 locais de ligação aos ZFs, separados por um espaçador de 5 ou 6 pb, que é reconhecido pela *FokI*. Um pequeno conector liga os ZFs à nuclease. Os ZFs são construídos para reconhecer a sequência “esquerda” e “direita” do local de ligação (Adaptada de HÄNDEL, ALWIN and CATHOMEN, 2009).

O 1º sucesso com um par de ZFN desenhado de origem para um alvo genómico foi obtida na *Drosophila*, em que ocorreu quer mutagenese direcionada, quer substituição de genes (BIBIKOVA *et al.*, 2002, 2003). Desde então, já foram desenhados, criados e usados com sucesso pares de ZFN em genes individuais numa variedade de tipos de células e organismos (CARROLL, 2011).

## 4.2. TALEN

No final de 2009, outra nuclease sintética surgiu como alternativa às ZFNs. As TALE são proteínas que as bactérias do género *Xanthomonas* injetam em células de plantas através dum sistema de secreção tipo III. Esta estrutura bacteriana permite a injeção de proteínas bacterianas diretamente no citoplasma da célula hospedeira (COBURN, SEKIROV and FINLAY, 2007; SCHOLZE and BOCH, 2011). Estas proteínas são compostas por um domínio N-terminal de translocação, um domínio central de repetição que medeia a ligação com o DNA e um domínio C-terminal de ativação da transcrição. Uma vez dentro da célula, estes fatores reconhecem os seus alvos no genoma e ativam a expressão de genes necessários para a multiplicação do agente patogénico e sua difusão (BOCH and BONAS, 2010).

O domínio que liga ao DNA consiste num arranjo em série de 15,5 a 19,5 repetições, cada uma com 34 aminoácidos, à exceção do último módulo, que contém 20 aminoácidos e é considerado como “meia repetição” (Figura 6) (BOCH and BONAS, 2010). A especificidade de cada repetição é conseguida graças ao polimorfismo existente nas posições 12 e 13, chamados de “di-resíduos variáveis da repetição” (RVDs), que ditam a especificidade dessa repetição para com o nucleótido, estabelecendo uma correspondência de 1:1 (1 repetição para 1 nucleótido) (CERMAK *et al.*, 2011; MORBITZER *et al.*, 2011).



**Figura 6** – Reconhecimento do DNA pela TALE. Uma TALE consiste num domínio N-terminal de translocação (DT), das repetições centrais (de 0 a 17,5), e da região C-terminal que inclui os sinais de localização nuclear (NLS) e o domínio de ativação da transcrição (DA). A sequência da repetição consiste em 34 aminoácidos, em que os resíduos 12 e 13 (RVDs) ditam a especificidade da repetição. As repetições centrais da TALE podem ser combinadas com uma nuclease para criar uma TALEN (Adaptada de MUSSOLINO and CATHOMEN, 2012).

Esta característica facilita a identificação da sequência genética alvo da célula hospedeira de TALEs naturais, assim como a conceção de TALEs direcionadas para um determinado alvo no genoma. Um olhar mais atento aos alvos naturais das TALEs revelou que estes são normalmente precedidos duma timidina, algo a ter em consideração quando se procuram potenciais alvos genéticos (BOCH and BONAS, 2010).

Outra característica que aumenta a possibilidade de aplicações das TALEs é a existência de RVDs com diferentes especificidades, isto é, alguns RVDS são muito específicos

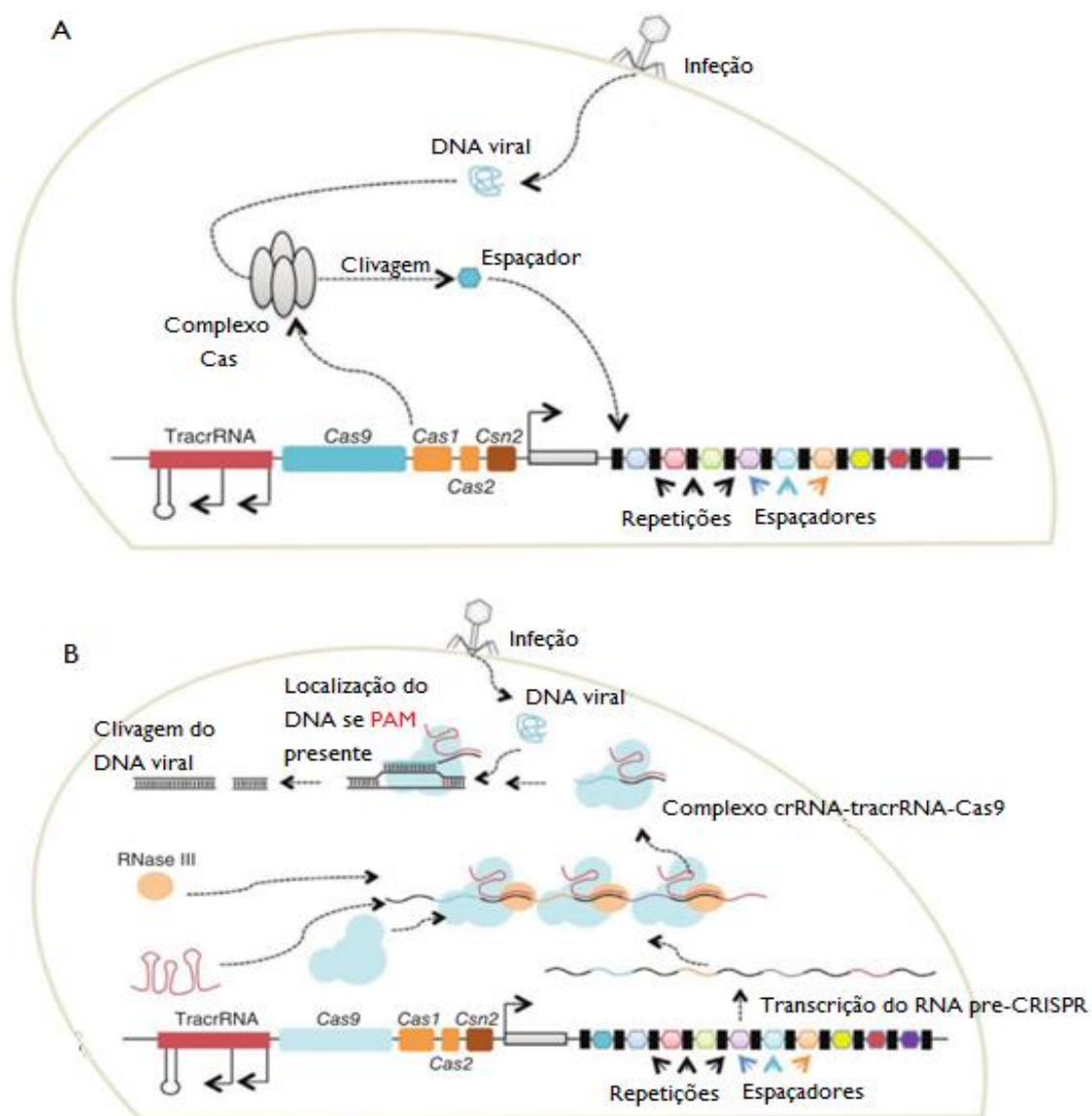
e apenas reconhecem um nucleótido, enquanto outros são menos seletivos, ligando-se a qualquer uma das bases (SCHOLZE and BOCH, 2011). Isto permite gerar TALEs capazes de se ligar a regiões que contenham polimorfismos dum nucleótido ou mesmo sequências mais degradadas (MUSSOLINO and CATHOMEN, 2012).

Dada a facilidade de desenhar TALEs específicas para diferentes sequências genéticas, foi óbvia a sua combinação com a nuclease *FokI*, criando assim as nucleases TALE (TALENs). Como a *FokI* só é ativa na forma dimérica (BITINAITE *et al.*, 1998), estas nucleases são compostas por pares ativos em que 2 monómeros se ligam a alvos adjacentes separadas por um espaçador de DNA que permite a formação dum dímero ativo que cliva a dupla cadeia (SMITH *et al.*, 2000).

As primeiras tentativas de uso de TALENs foram baseadas nas TALEs naturais em que o domínio C-terminal de ativação foi substituído pela nuclease *FokI*. Estas nucleases foram submetidas a ensaios com genes marcadores e mostraram propriedades de clivagem em plantas e leveduras (CHRISTIAN *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011). Entretanto, foram desenvolvidas TALENs com maior atividade através do encurtamento dos resíduos N e C-terminais (MILLER *et al.*, 2011; MUSSOLINO *et al.*, 2011). Estas TALENs encurtadas conseguiram uma modificação de alelos alvos até 20% e menor citotoxicidade em comparação com as ZFNs (MUSSOLINO *et al.*, 2011).

### **4.3. CRISPR/Cas**

O sistema bacteriano CRISPR/Cas (proteínas associadas ao CRISPR) é a mais recente tecnologia de EG com base em nucleases (SEGAL and MECKLER, 2013). Este sistema de imunidade adaptativa usa pequenas cadeias de RNA para degradar ácidos nucleicos desconhecidos (HORVATH and BARRANGOU, 2010; WIEDENHEFT, STERNBERG and DOUDNA, 2012).



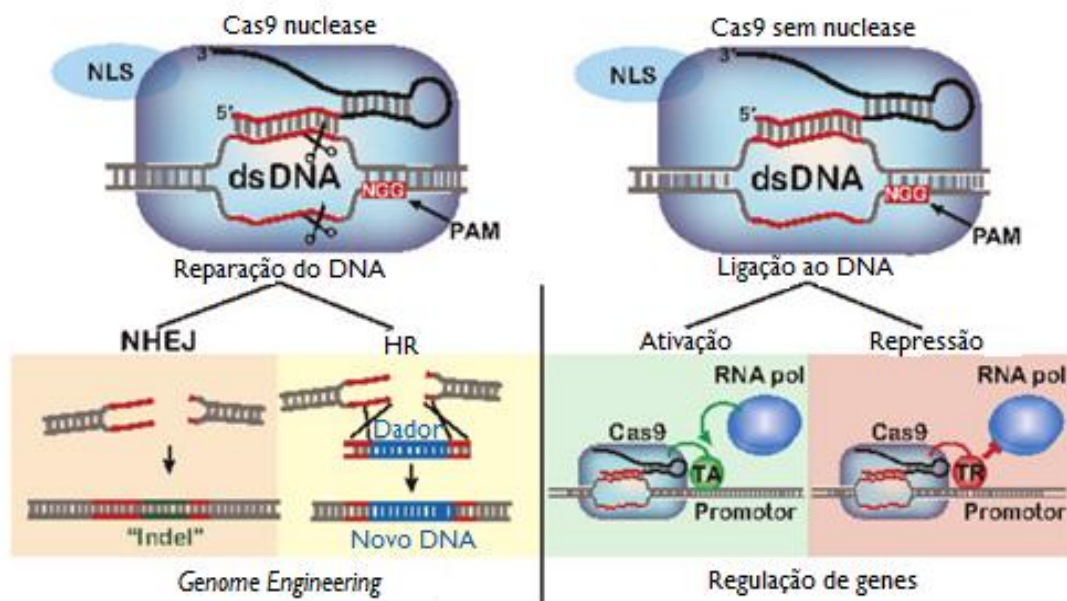
**Figura 7** – Funcionamento do sistema CRISPR/Cas tipo II em bactérias. (A) Na fase de imunização, o sistema CRISPR armazena no seu gene fragmentos de um fago invasor ou um plasmídeo de DNA como espaçadores. (B) Na fase de imunidade, a bactéria usa a informação guardada para se defender contra agentes patogênicos através da transcrição do gene e seu processamento, que resulta num CRISPR RNA (crRNA) que guia a nuclease ao local de clivagem complementar ao espaçador. Primeiro, o tracrRNA hibridiza com as repetições do pre-crRNA. Segundo, a RNase III endógena cliva o crRNA-tracrRNA, formando o complexo crRNA-tracrRNA-Cas9. Este complexo só quebra as sequências complementares ao “protoespaçador” se a sequência PAM estiver presente (Adaptada de MALI, ESVELT and CHURCH, 2013)

O sistema CRISPR/Cas proporciona imunidade através da incorporação de fragmentos de fagos invasores ou plasmídeos de DNA nos seus *loci*, usando os CRISPR RNAs (crRNAs) correspondentes para guiar a degradação de sequências homólogas (Figura 7A) (TERNS and TERNS, 2011). Cada *locus* do CRISPR codifica “espaçadores” adquiridos, que estão separados por sequências repetitivas. A transcrição do *locus* produz um pré-crRNA (uma cadeia de RNA constituída por todos os espaçadores e repetições), que é processado num crRNA, que consiste em fragmentos espaçador-repetição que guiam



complexos de nucleases efetoras para clivar sequências de DNA de cadeia dupla (dsDNA) complementares ao espaçador (Figura 7B) (BARRANGOU *et al.*, 2007; BROUNS *et al.*, 2008).

O sistema efetor tipo II dos sistemas CRISPR/Cas foi desenvolvido para efetuar modificações genômicas robustas guiadas por cadeias de ácido ribonucleico (RNA) em vários sistemas eucariotas. (CONG *et al.*, 2013; MALI *et al.*, 2013). Este consiste numa longa cadeia de pré-crRNA transcrita dum *locus* CRISPR, uma proteína Cas9 multifuncional e um crRNA de trans-ativação (tracrRNA), importante para o processamento do pré-crRNA e formação do complexo Cas9 (HORVATH and BARRANGOU, 2010).



**Figura 8** – Aplicações da Cas. A Cas9 localiza o seu alvo através da Sequência Motivo Adjacente ao Proto-espaçador (PAM) e o do emparelhamento entre o crRNA e o DNA alvo. A nuclease Cas9 pode ser facilmente programada para localizar qualquer sequência de DNA com um PAM adjacente através da construção dum crRNA complementar à sequência alvo. DSBs são reparadas por NHEJ ou RH. A NHEJ é propensa a erros, que resultam em inserções ou deleções que perturbam a sequência alvo. A RH usa uma sequência dador *template* para entregar DNA exógeno numa localização específica. Em alternativa, a Cas9 sem nuclease pode ser usada para promover a transcrição de genes através de ativadores de transcrição (TA), ou inibir a transcrição através dum repressor da transcrição (TR) (Adaptada de WILKINSON and WIEDENHEFT, 2014).

A interferência pelo sistema CRISPR tipo II é um processo com várias fases (DELTCHEVA *et al.*, 2011). Primeiro, o tracrRNA hibridiza com as regiões de repetição do pre-crRNA. De seguida, a RNase III endógena cliva o híbrido crRNA-tracrRNA e remove a terminação 5' de cada espaçador, produzindo assim crRNAs maduros que continuam associados ao tracrRNA e ao Cas9. Por último, cada complexo localiza a sequência de dsDNA alvo e corta ambas as cadeias. Embora os mecanismos que permitem a localização do alvo ainda sejam desconhecidos, o reconhecimento do alvo e a sua clivagem pelo complexo crRNA-tracrRNA-Cas9 necessitam de complementaridade entre o espaçador e o

proto-espçador alvo, assim como a presença duma seqüência motivo adjacente ao proto-espçador (PAM) na terminaçã 3' da seqüência do proto-espçador (GASIUNAS *et al.*, 2012; JINEK *et al.*, 2012). A PAM é um componente essencial para a localizaçã, mas que também serve para prevenir que o próprio locus do CRISPR se torne um alvo (MALI, ESVELT and CHURCH, 2013).

A aplicaçã deste sistema para EG dum dado organismo requer uma reconstituçã apropriada do complexo crRNA-tracrRNA-Cas9. Em células humanas, é necessária a expressã da proteína Cas9 otimizada para o codã humano e com um sinal de localizaçã nuclear (NLS) apropriado, assim como a expressã, individualmente ou como quimera, de crRNA e tracrRNA através dum promotor da RNA polimerase III (CONG *et al.*, 2013; MALI *et al.*, 2013). Em alternativa, o RNA transcrito *in vitro* pode ser entregue diretamente às células alvo (CHO *et al.*, 2013; HWANG *et al.*, 2013). Expressar um crRNA-tracrRNA quimérico, também conhecido por RNA guia (sgRNA), é a via mais comum devido à maior simplicidade e robustez da localizaçã do alvo genético (MALI *et al.*, 2013). A eficácia de ediçã da Cas9 é comparável aos ZFN e TALENs, mas o uso de RNAs para programar a Cas9 é mais simples, fiável e barato (GRATZ *et al.*, 2013; HOU *et al.*, 2013; MALI *et al.*, 2013). Esta metodologia já foi usada para editar genomas em vários organismos eucariotas (CHO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013).

A versatilidade e potencial da Cas9 residem na sua capacidade de conseguir juntar as 3 grandes classes de biopolímeros (Figura 8). Podem ser “enviadas” proteínas para qualquer seqüência de DNA através da sua fusã com uma Cas9 “sem nuclease” (BIKARD *et al.*, 2013; QI *et al.*, 2013) e da expressã dum sgRNA adequado, e o mesmo pode ser feito com moléculas de RNA (MALI *et al.*, 2013).

## **5. Aplicações terapêuticas**

O uso de nucleases na terapêutica representa uma mudançã de paradigma na terapia génica. Ao contrário dos métodos convencionais que apenas tratam os sintomas da doençã ou integram fatores terapêuticos no genoma, as nucleases são capazes de, em teoria, corrigir a causa da doençã, eliminando permanentemente os sintomas com modificaçães genéticas precisas (GAJ, GERSBACH and BARBAS, 2013). As nucleases também tiveram impacto no aparecimento de novos modelos de doençã (Tabela 2) e novos modelos animais (Tabela 3).

## 5.1. ZFN

Em teoria, qualquer gene em qualquer organismo pode ser localizado com um par de ZFNs devidamente construído para tal, dependendo o seu reconhecimento da correspondência com a sequência de DNA (CARROLL, 2011).

**Tabela 1** – Ensaios clínicos em curso (dados retirados do *ClinicalTrials.gov*)

Ensaios clínicos	Fase do estudo	Início e fim	Nº de doentes	Outcomes
<b>NCT00842634 – Células T autólogas geneticamente modificadas no gene CCR5 por ZFN SB-728 para o VIH</b>	Fase I	De janeiro 2009 a janeiro 2013	12 doentes	Avaliar efeitos adversos relacionados com o tratamento (12 meses); Avaliar a reconstituição imunitária e a resistência do VIH.
<b>NCT01044654 – Estudo de aumento da dose das células T autólogas geneticamente modificadas por ZFN em doentes infetados com VIH</b>	Fase I	De dezembro 2009 a dezembro 2014 (previsto)	33 doentes	Avaliar efeitos adversos relacionados com o tratamento (12 meses após a 1ª infusão); Avaliar a atividade a longo prazo.
<b>NCT01252641 - Estudo de células T autólogas geneticamente modificadas por ZFN em doentes infetados com VIH</b>	Fase I/II	De novembro 2010 a setembro 2013	21 doentes	Avaliar a segurança e tolerabilidade do tratamento (12 meses); avaliar a virémia, o nº de células T, e a presença da ZFN (SB-728-T) no sangue periférico (12 meses).

No campo dos modelos animais, os ZFNs estão a ter grande impacto em espécies que não eram utilizadas no âmbito da EG. Já foi feita a inativação de vários genes no peixe zebra recorrendo a esta tecnologia e espera-se que a investigação desta tecnologia gere novos métodos de substituição homóloga de gene (DOYON *et al.*, 2008; MENG *et al.*, 2008). Injeções embrionárias de mRNAs de ZFN criam a expectativa de produção de mutações “localizadas” no rato (GEURTS *et al.*, 2009).

Atualmente, decorrem e aguarda-se a publicação de resultados de 3 ensaios clínicos de fase I envolvendo ZFNs, representando a 1ª de várias aplicações terapêuticas possíveis em humanos (Tabela 1) (GAJ, GERSBACH and BARBAS, 2013; URNOV ET AL., 2010). Os ZFNs estão a ser usados para conferir resistência ao vírus da imunodeficiência humana I (VIH-I) através da inativação do gene do recetor da quimiocina C-C tipo 5 (CCR5), induzida por NHEJ. A proteína CCR5 é um co-recetor do VIH-I e os indivíduos que não possuem esta

proteína resistem à progressão para a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) após infecção por VIH. O protocolo clínico envolve o isolamento dos precursores das células T, mutagénese de alta eficiência do gene CCR5 com um par de ZFNs, crescimento das células e reimplantação das mesmas no dador. Esta metodologia permite fornecer um conjunto de células resistentes ao VIH para reconstituir o sistema imunitário do doente (CARROLL, 2011; GAJ, GERSBACH and BARBAS, 2013; SEGAL and MECKLER, 2013; URNOV *et al.*, 2010).

Até à data, a RH induzida por ZFNs já foi usada para corrigir mutações causadoras de doença em células estaminais pluripotentes induzidas, tais como anemia falciforme (SEBASTIANO *et al.*, 2011; ZOU *et al.*, 2011) ou deficiência em  $\alpha$ 1-antitripsina (YUSA *et al.*, 2011). A investigação que continua a ser feita em relação às células estaminais vai permitir, num futuro próximo, tratamentos com base na transplantação autóloga (CARROLL, 2011; GAJ, GERSBACH and BARBAS, 2013).

**Tabela 2** - Estudos pré-clínicos em modelos de doença

<b>Doença</b>	<b>Tecnologia</b>	<b>Modelo</b>	<b>Referências</b>
Hemofilia	ZFN	Murganhos	(LI <i>et al.</i> , 2011)
Anemia falciforme	ZFN	Células estaminais pluripotentes induzidas	(SEBASTIANO <i>et al.</i> , 2011; ZOU <i>et al.</i> , 2011)
Deficiência em $\alpha$ 1-antitripsina	ZFN	Células estaminais pluripotentes induzidas	(YUSA <i>et al.</i> , 2011)
Doença de Parkinson (SNCA)	ZFN	Células estaminais pluripotentes induzidas	(SOLDNER <i>et al.</i> , 2011)
Distrofia muscular de Duchenne	TALEN	Fibroblastos dérmicos provenientes do doente	(OUSTEROUT <i>et al.</i> , 2013)
Epidermólise bolhosa	TALEN	Células estaminais pluripotentes induzidas (modelo de pele <i>in vivo</i> )	(OSBORN <i>et al.</i> , 2013)
Tirosinémia	CRISPR	Murganhos	(YIN <i>et al.</i> , 2014)

## 5.2. TALEN

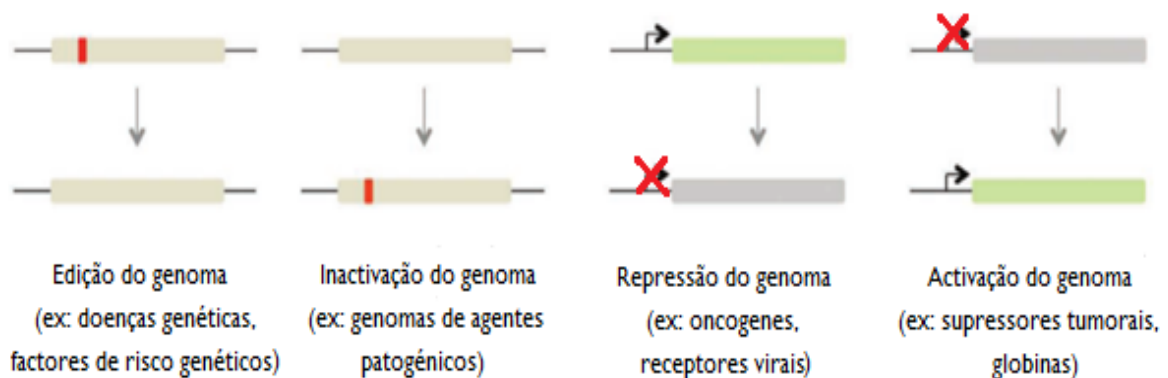
Com o desenvolvimento das TALENs, estas têm sido aplicadas com sucesso numa variedade de organismos, como os nemátodos (WOOD *et al.*, 2011), o peixe zebra (HUANG *et al.*, 2011; SANDER *et al.*, 2011) e ratos (TESSON *et al.*, 2011), assim como em células estaminais embrionárias e em pluripotentes induzidas (HOCKEMEYER *et al.*, 2011).

Futuras aplicações das TALENs incluem o estudo da função de genes ou promotores em organismos ou linhas celulares, a marcação de genes endógenos, e a integração direcionada dum transgene num local neutro do genoma (LOMBARDO *et al.*, 2011). No contexto da biologia sintética, a integração localizada irá permitir a geração de linhas

celulares humanas isogénicas com 2 grandes vantagens em relação às técnicas normais de manipulação genética: efeitos mínimos de integração do transgene dependentes do local e a não perturbação funcional do transcriptoma da célula hospedeira (DEKELVER *et al.*, 2010; LOMBARDO *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2008). Outras aplicações podem envolver o desenvolvimento de linhas celulares que produzam proteínas especificamente desenhadas para biotecnologia, assim como na terapia génica humana com bases na edição de genes causadores de doenças em células estaminais transplantáveis (MUSSOLINO and CATHOMEN, 2012).

### 5.3. CRISPR/Cas

Apesar de ser a tecnologia mais recente, a simplicidade de programação das nucleases Cas9 contribuiu para a sua rápida implementação pela comunidade de EG (WILKINSON and WIEDENHEFT, 2014). O futuro das Cas9 na terapêutica pode seguir 2 vias. A 1ª implica a edição localizada do genoma para corrigir doenças genéticas e, possivelmente, desfazer genomas virais invasores (LI *et al.*, 2011; URNOV *et al.*, 2005). A 2ª usa Cas9 “sem nuclease” para regulação genómica, quer para ativação, quer para repressão. Esta abordagem pode vir a corrigir desregulações epigenéticas da expressão génica para controlar a inflamação ou autoimunidade, assim como para reprimir a transcrição de genes virais em células vulneráveis (Figura 9) (MALI, ESVELT and CHURCH, 2013).



**Figura 9** – Aplicações terapêuticas. Potenciais aplicações terapêuticas das nucleases, que incluem a edição e a inativação do genoma para corrigir doenças genéticas e a regulação do genoma para alterar os níveis de proteínas endógenas (Adaptada de MALI, ESVELT and CHURCH, 2013).

Recentemente, foi demonstrado o potencial da CRISPR/Cas9 para a edição genómica *in vivo* em murganhos adultos. Estes possuíam uma mutação no gene *Fah* nos hepatócitos, que causa tirosinémia, uma doença genética fatal. Foram utilizados sgRNAs localizadores do *Fah* e um DNA de cadeia simples (ssDNA) com o gene *Fah* sem mutação para facilitar a RH. Os resultados foram promissores visto que os murganhos aos quais foram injetados o Cas9

continham quer o gene mutado, quer o gene corrigido, o que demonstra uma edição parcial do genoma dos hepatócitos (YIN *et al.*, 2014).

**Tabela 3** - Organismos modificados por EG

<b>Tecnologia utilizada</b>	<b>Organismo (gene)</b>	<b>Tipo de modificação</b>	<b>Referências</b>
<b>ZFN</b>	Humano ( <i>CCR5</i> )	Adição de gene; inativação de gene	(LOMBARDO <i>et al.</i> , 2011)
	Humano ( <i>TCR</i> )	Inativação do gene	(TORIKAI <i>et al.</i> , 2012)
	Humano ( <i>AAVS1</i> )	Adição de gene	(LOMBARDO <i>et al.</i> , 2011)
	Peixe zebra ( <i>ntl</i> )	Inativação do gene	(DOYON <i>et al.</i> , 2008)
	Porco ( <i>GGTA1</i> )	Inativação do gene	(HAUSCHILD <i>et al.</i> , 2011)
	Rato ( <i>IgM</i> )	Inativação do gene	(GEURTS <i>et al.</i> , 2009)
	Murganho ( <i>Rosa26</i> )	Adição de gene	(PEREZ-PINERA <i>et al.</i> , 2012)
	Drosophila ( <i>yellow</i> )	Inativação do gene; correção de gene	(BIBIKOVA <i>et al.</i> , 2002)
	Milho ( <i>IPK1</i> )	Adição de gene	(SHUKLA <i>et al.</i> , 2009)
	Tabaco ( <i>SuRA</i> )	Correção do gene	(TOWNSEND <i>et al.</i> , 2009)
<b>TALEN</b>	Humano ( <i>CCR5</i> )	Inativação do gene	(MUSSOLINO <i>et al.</i> , 2011)
	Peixe zebra ( <i>th</i> )	Adição de gene	(ZU <i>et al.</i> , 2013)
	Arroz ( <i>OsSWEET14</i> )	Inativação do gene	(LI <i>et al.</i> , 2012)
	Bovino ( <i>ACAN12</i> )	Inativação do gene	(CARLSON <i>et al.</i> , 2012)
	Porco ( <i>LDLR</i> )	Inativação do gene	(CARLSON <i>et al.</i> , 2012)
<b>CRISPR/Cas</b>	Humano ( <i>CCR5</i> )	Adição de gene	(CHO <i>et al.</i> , 2013)
	Murganho ( <i>Fah</i> )	Correção do gene	(YIN <i>et al.</i> , 2014)

## **6. Barreiras a ultrapassar**

Como referido anteriormente, o futuro das nucleases na terapia génica é bastante promissor, contudo ainda existem alguns problemas que necessitam de ser solucionados para que o uso destas tecnologias possa avançar para a clínica.

O maior problema comum às três tecnologias é a atividade *off-target* das nucleases, isto é, quando as nucleases clivam a cadeia de DNA fora do local desejado. Quando esta é extensa, o número de cortes na dupla cadeia é maior que a capacidade de reparação do

DNA, o que leva a morte da célula ou organismo (ALWIN *et al.*, 2005; BIBIKOVA *et al.*, 2002). A atividade *off-target* pode ser devida a vários fatores: a especificidade da nuclease, isto é, a capacidade do domínio de ligação ao DNA reconhecer locais de ligação que não sejam o seu alvo (HÄNDEL and CATHOMEN, 2011; MALI, ESVELT and CHURCH, 2013); a dimerização da *FokI* em homodímero, ou seja, as duas subunidades são idênticas (GABRIEL *et al.*, 2011); e os conectores entre o domínio de ligação ao DNA e o de clivagem podem abranger espaçadores diferentes do escolhido no local alvo (GABRIEL *et al.*, 2011; PATTANAYAK *et al.*, 2011). Têm sido feitos esforços para ultrapassar estas limitações dos ZFNs, como a produção de arranjos de ZFs com maior especificidade (MAEDER *et al.*, 2008; MENG *et al.*, 2008), obrigar a heterodimerização da *FokI* (DOYON *et al.*, 2011; SZCZEPEK *et al.*, 2007) e otimização dos conectores (BIBIKOVA ET AL., 2001; HÄNDEL, ALWIN and CATHOMEN, 2009). Estes conceitos podem também ser aplicados nas TALENs.

Dois estudos (GABRIEL *et al.*, 2011; PATTANAYAK *et al.*, 2011) demonstraram que as ZFNs têm atividade *off-target* em várias regiões do genoma que partilham uma certa homologia com o seu verdadeiro alvo. Algumas ZFNs toleraram até 8 pb diferentes num alvo de 24 pb, o que significa que um par de ZFNs se pode ligar a um local do genoma que partilhe uma homologia de 66% com o verdadeiro local de ligação (MUSSOLINO and CATHOMEN, 2011). Também já foi demonstrado que as TALENs se ligam a alvos com diferenças em alguns nucleótidos (SCHOLZE and BOCH, 2011), mas é necessário esclarecer o número máximo de nucleótidos diferentes que a TALE tolera.

Para uso em análises genéticas em modelos animais ou celulares, uma baixa frequência de *off-target* é tolerada. Já quando se trata de terapia génica humana, é preciso extremo cuidado para evitar alterações genómicas indesejadas e danosas, que podem levar à oncogénese (CARROLL, 2011).

Existem também limitações ao nível da entrega destas enzimas às células desejadas. Normalmente, os genes que codificam as nucleases são entregues às células por plasmídeos de DNA, vetores virais ou RNA mensageiro (mRNA) transcrito *in vitro*. Contudo, existem deficiências nos sistemas de entrega atuais que restringem as possíveis aplicações das nucleases. Em particular, a transfecção de plasmídeos ou mRNA por electroporação ou reagentes catiónicos lipofílicos podem ser tóxicos e são limitados a certo tipo de células. Os vetores virais também apresentam limitações porque são complexos, difíceis de produzir, potencialmente imunogénicos e envolvem barreiras regulamentares (GAJ, GERSBACH and BARBAS, 2013). Os retrovírus, em particular, apresentam riscos associados à integração no genoma hospedeiro tais como a potencial oncogénese e disrupção de genes. Uma alternativa

são os vetores lentivirais deficientes em integrase para entrega em células resistentes à transfeção (LOMBARDO *et al.*, 2007). No caso da Cas9, o seu tamanho pode constituir um impedimento à sua entrega às células alvo. Estas são longas, com 1368 aminoácidos de comprimento, o que pode impossibilitar a clonagem em vetores virais adenoassociados. A solução pode passar pelo uso de Cas9 ortólogos de menor dimensão ou construir um Cas9 menor através da remoção de domínios desnecessários para a finalidade desejada, que pode permitir o transporte em vetores virais para transporte *in vivo* (GRIEGER and SAMULSKI, 2005).

Por fim, é necessário ter em atenção a resposta imune às nucleases. Uma opção é uso de imunossuppressores durante o tratamento, mas esta técnica não é tão útil no caso de modificações regulatórias de longo prazo (MALI, ESVELT and CHURCH, 2013). Uma estratégia mais promissora envolve analisar a imunogenicidade da Cas9 e “humanizar” os fragmentos peptídicos relevantes, como já foi feito na terapêutica com anticorpos (RIECHMANN *et al.*, 1988).

## **7. Conclusão**

Desde 2010 que o número de publicações relacionadas com este tema tem registado um aumento exponencial, assim como, entre 2002 e 2012, aumentaram os grupos de investigação que tiram partido destas novas tecnologias de GE na sua pesquisa. Este rápido crescimento resulta, em parte, de uma descida dos custos de produção das ZFNs e TALENs, devido a um maior número de empresas a produzir estas nucleases para alvos específicos. O preço original para criar uma ZFN customizada rondava os 25000 dólares, mas em 2013 já custava cerca de 6000 dólares. Já o custo de produção de uma TALEN situava-se entre os 1500 e os 5000 dólares. A *Sangamo Biosciences*, em parceria com a *Sigma-Aldrich*, destaca-se na produção de ZFNs, enquanto a *Cellectis BioResearch* foca-se nas TALENs (PEREZ-PINERA, OUSTEROUT and GERSBACH, 2012; SEGAL and MECKLER, 2013).

As ZFNs, TALENs e CRISPR/Cas são ferramentas de EG que apresentam um enorme potencial na investigação genética e na medicina personalizada (GAJ, GERSBACH and BARBAS, 2013). Contudo, e apesar dos avanços feitos nos últimos anos, estas tecnologias ainda se encontram distantes do que é proposto como a ferramenta ideal de EG. Esta deve cumprir os seguintes critérios: a) elevado rendimento de transformações genéticas nas células alvo; b) nenhuma atividade *off-target*; c) métodos de entrega eficazes; e d) produção rápida, eficaz e a baixo custo para qualquer local do genoma (PEREZ-PINERA, OUSTEROUT and GERSBACH, 2012). Destes critérios, a atividade *off-target* é o que acarreta mais



problemas de segurança (ao nível da citotoxicidade), sendo a grande barreira da transposição desta tecnologia para a clínica.

Os próximos desenvolvimentos destas tecnologias devem-se focar na redução da atividade *off-target*; na melhoria da entrega das nucleases às células alvo, através da produção de transportadores mais eficazes; no aumento da eficácia das nucleases; e no controlo do mecanismo de reparação de DNA. Também é necessário conhecer o perfil de segurança destas moléculas a longo prazo.

A presença duma molécula de ZFN em ensaios clínicos marca o início do que pode ser uma revolução na medicina. A maior acessibilidade destes métodos aos grupos de investigação permite uma democratização da EG e, conseqüentemente, um maior conhecimento sobre os benefícios e os riscos destas tecnologias. Será irrealista esperar que estas tecnologias não apresentem efeitos secundários a nível genético, por isso, é fundamental atingir um equilíbrio entre os riscos e os benefícios para o doente para que, num futuro próximo, estas sejam as bases de tratamento de doenças genéticas.

## **8. Bibliografia**

ALWIN, Stephen; GERE, Maja B.; GUHL, Eva; EFFERTZ, Karin; BARBAS, Carlos F.; SEGAL, David J.; WEITZMAN, Matthew D.; CATHOMEN, Toni - Custom zinc-finger nucleases for use in human cells. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**. . ISSN 1525-0016. 12:4 (2005) 610–7. doi: 10.1016/j.ymthe.2005.06.094.

**Autologous T-Cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases SB-728 for HIV - Tabular View - ClinicalTrials.gov** - [Em linha] [Consult. 14 jul. 2014]. Disponível em WWW:<URL:<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00842634>>.

BARRANGOU, Rodolphe; FREMAUX, Christophe; DEVEAU, Hélène; RICHARDS, Melissa; BOYAVAL, Patrick; MOINEAU, Sylvain; ROMERO, Dennis A.; HORVATH, Philippe - CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**. . ISSN 1095-9203. 315:5819 (2007) 1709–12. doi: 10.1126/science.1138140.

BEERLI, Roger R.; BARBAS, Carlos F. - Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. **Nature biotechnology**. . ISSN 1087-0156. 20:2 (2002) 135–41. doi: 10.1038/nbt0202-135.

BIBIKOVA, M.; CARROLL, D.; SEGAL, D. J.; TRAUTMAN, J. K.; SMITH, J.; KIM, Y. G.; CHANDRASEGARAN, S. - Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. **Molecular and cellular biology**. . ISSN 0270-7306. 21:1 (2001) 289–97. doi: 10.1128/MCB.21.1.289-297.2001.

BIBIKOVA, Marina; BEUMER, Kelly; TRAUTMAN, Jonathan K.; CARROLL, Dana - Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. **Science**. . ISSN 1095-9203. 300:5620 (2003) 764. doi: 10.1126/science.1079512.

BIBIKOVA, Marina; GOLIC, Mary; GOLIC, Kent G.; CARROLL, Dana - Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. **Genetics**. . ISSN 0016-6731. 161:3 (2002) 1169–75.

BIKARD, David; JIANG, Wenyan; SAMAI, Poulami; HOCHSCHILD, Ann; ZHANG, Feng; MARRAFFINI, Luciano A. - Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. **Nucleic acids research**. . ISSN 1362-4962. 41:15 (2013) 7429–37. doi: 10.1093/nar/gkt520.

BITINAITE, J.; WAH, D. A.; AGGARWAL, A. K.; SCHILDKRAUT, I. - FokI dimerization is required for DNA cleavage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 0027-8424. 95:18 (1998) 10570–5.

BOCH, Jens; BONAS, Ulla - *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. **Annual review of phytopathology**. . ISSN 0066-4286. 48:2010) 419–36. doi: 10.1146/annurev-phyto-080508-081936.

BOGDANOVA, Adam J.; SCHORNACK, Sebastian; LAHAYE, Thomas - TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. **Current opinion in plant biology**. . ISSN 1879-0356. 13:4 (2010) 394–401. doi: 10.1016/j.pbi.2010.04.010.

BROUNS, Stan J. J.; JORE, Matthijs M.; LUNDGREN, Magnus; WESTRA, Edze R.; SLIJKHUIS, Rik J. H.; SNIJDERS, Ambrosius P. L.; DICKMAN, Mark J.; MAKAROVA, Kira S.; KOONIN, Eugene V.; OOST, John VAN DER - Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. **Science**. . ISSN 1095-9203. 321:5891 (2008) 960–4. doi: 10.1126/science.1159689.

CAPECCHI, Mario R. - Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. **Nature reviews. Genetics**. . ISSN 1471-0056. 6:6 (2005) 507–12. doi: 10.1038/nrg1619.

CARLSON, Daniel F.; TAN, Wenfang; LILLICO, Simon G.; STVERAKOVA, Dana; PROUDFOOT, Chris; CHRISTIAN, Michelle; VOYTAS, Daniel F.; LONG, Charles R.; WHITELAW, C. Bruce A.; FAHRENKRUG, Scott C. - Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 1091-6490. 109:43 (2012) 17382–7. doi: 10.1073/pnas.1211446109.

CARROLL, Dana - Genome engineering with zinc-finger nucleases. **Genetics**. . ISSN 1943-2631. 188:4 (2011) 773–82. doi: 10.1534/genetics.111.131433.

CERMAK, Tomas; DOYLE, Erin L.; CHRISTIAN, Michelle; WANG, Li; ZHANG, Yong; SCHMIDT, Clarice; BALLER, Joshua A.; SOMIA, Nikunj V; BOGDANOVE, Adam J.; VOYTAS, Daniel F. - Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. **Nucleic acids research**. . ISSN 1362-4962. 39:12 (2011) e82. doi: 10.1093/nar/gkr218.

CHO, Seung Woo; KIM, Sojung; KIM, Jong Min; KIM, Jin-Soo - Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nature biotechnology**. . ISSN 1546-1696. 31:3 (2013) 230–2. doi: 10.1038/nbt.2507.

CHRISTIAN, Michelle; CERMAK, Tomas; DOYLE, Erin L.; SCHMIDT, Clarice; ZHANG, Feng; HUMMEL, Aaron; BOGDANOVE, Adam J.; VOYTAS, Daniel F. - Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. **Genetics**. . ISSN 1943-2631. 186:2 (2010) 757–61. doi: 10.1534/genetics.110.120717.

COBURN, Bryan; SEKIROV, Inna; FINLAY, B. Brett - Type III secretion systems and disease. **Clinical microbiology reviews**. . ISSN 0893-8512. 20:4 (2007) 535–49. doi: 10.1128/CMR.00013-07.

CONG, Le; RAN, F. Ann; COX, David; LIN, Shuailiang; BARRETTO, Robert; HABIB, Naomi; HSU, Patrick D.; WU, Xuebing; JIANG, Wenyan; MARRAFFINI, Luciano A.; ZHANG, Feng - Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**. . ISSN 1095-9203. 339:6121 (2013) 819–23. doi: 10.1126/science.1231143.

DEKELVER, Russell C. *et al.* - Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. **Genome research**. . ISSN 1549-5469. 20:8 (2010) 1133–42. doi: 10.1101/gr.106773.110.

DELTCHEVA, Elitza; CHYLINSKI, Krzysztof; SHARMA, Cynthia M.; GONZALES, Karine; CHAO, Yanjie; PIRZADA, Zaid A.; ECKERT, Maria R.; VOGEL, Jörg; CHARPENTIER,

Emmanuelle - CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**. . ISSN 1476-4687. 471:7340 (2011) 602–7. doi: 10.1038/nature09886.

DOYON, Yannick; MCCAMMON, Jasmine M.; MILLER, Jeffrey C.; FARAJI, Farhoud; NGO, Catherine; KATIBAH, George E.; AMORA, Rainier; HOCKING, Toby D.; ZHANG, Lei; REBAR, Edward J.; GREGORY, Philip D.; URNOV, Fyodor D.; AMACHER, Sharon L. - Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. **Nature biotechnology**. . ISSN 1546-1696. 26:6 (2008) 702–8. doi: 10.1038/nbt1409.

DOYON, Yannick; VO, Thuy D.; MENDEL, Matthew C.; GREENBERG, Shon G.; WANG, Jianbin; XIA, Danny F.; MILLER, Jeffrey C.; URNOV, Fyodor D.; GREGORY, Philip D.; HOLMES, Michael C. - Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. **Nature methods**. . ISSN 1548-7105. 8:1 (2011) 74–9. doi: 10.1038/nmeth.1539.

GABRIEL, Richard; LOMBARDO, Angelo; ARENS, Anne; MILLER, Jeffrey C.; GENOVESE, Pietro; KAEPPEL, Christine; NOWROUZI, Ali; BARTHOLOMAE, Cynthia C.; WANG, Jianbin; FRIEDMAN, Geoffrey; HOLMES, Michael C.; GREGORY, Philip D.; GLIMM, Hanno; SCHMIDT, Manfred; NALDINI, Luigi; KALLE, Christof VON - An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. **Nature biotechnology**. . ISSN 1546-1696. 29:9 (2011) 816–23. doi: 10.1038/nbt.1948.

GAJ, Thomas; GERSBACH, Charles A; BARBAS, Carlos F. - ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in biotechnology**. . ISSN 1879-3096. 31:7 (2013) 397–405. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004.

GASIUNAS, Giedrius; BARRANGOU, Rodolphe; HORVATH, Philippe; SIKSNYS, Virginijus - Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 1091-6490. 109:39 (2012) E2579–86. doi: 10.1073/pnas.1208507109.

GEURTS, Aron M. *et al.* - Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. **Science**. . ISSN 1095-9203. 325:5939 (2009) 433. doi: 10.1126/science.1172447.

GRATZ, Scott J.; CUMMINGS, Alexander M.; NGUYEN, Jennifer N.; HAMM, Danielle C.; DONOHUE, Laura K.; HARRISON, Melissa M.; WILDONGER, Jill; O'CONNOR-GILES, Kate M. - Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. **Genetics**. . ISSN 1943-2631. 194:4 (2013) 1029–35. doi: 10.1534/genetics.113.152710.

GRIEGER, Joshua C.; SAMULSKI, Richard J. - Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**. . ISSN 0724-6145. 99:2005) 119–45.

HÄNDEL, Eva-Maria; ALWIN, Stephen; CATHOMEN, Toni - Expanding or restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: the inter-domain linker as a major determinant of target site selectivity. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**. . ISSN 1525-0024. 17:1 (2009) 104–11. doi: 10.1038/mt.2008.233.

HÄNDEL, Eva-Maria; CATHOMEN, Toni - Zinc-finger nuclease based genome surgery: it's all about specificity. **Current gene therapy**. . ISSN 1875-5631. 11:1 (2011) 28–37.

HAUSCHILD, Janet; PETERSEN, Bjoern; SANTIAGO, Yolanda; QUEISSER, Anna-Lisa; CARNWATH, Joseph W.; LUCAS-HAHN, Andrea; ZHANG, Lei; MENG, Xiangdong; GREGORY, Philip D.; SCHWINZER, Reinhard; COST, Gregory J.; NIEMANN, Heiner - Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 1091-6490. 108:29 (2011) 12013–7. doi: 10.1073/pnas.1106422108.

HOCKEMEYER, Dirk *et al.* - Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. **Nature biotechnology**. . ISSN 1546-1696. 29:8 (2011) 731–4. doi: 10.1038/nbt.1927.

HORVATH, Philippe; BARRANGOU, Rodolphe - CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. **Science**. . ISSN 1095-9203. 327:5962 (2010) 167–70. doi: 10.1126/science.1179555.

HOU, Zhonggang; ZHANG, Yan; PROPSON, Nicholas E.; HOWDEN, Sara E.; CHU, Li-Fang; SONTHEIMER, Erik J.; THOMSON, James A. - Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 1091-6490. 110:39 (2013) 15644–9. doi: 10.1073/pnas.1313587110.

HUANG, Peng; XIAO, An; ZHOU, Mingguo; ZHU, Zuoyan; LIN, Shuo; ZHANG, Bo - Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. **Nature biotechnology**. . ISSN 1546-1696. 29:8 (2011) 699–700. doi: 10.1038/nbt.1939.

HWANG, Woong Y.; FU, Yanfang; REYON, Deepak; MAEDER, Morgan L.; TSAI, Shengdar Q.; SANDER, Jeffrey D.; PETERSON, Randall T.; YEH, J. R. Joanna; JOUNG, J. Keith - Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. **Nature biotechnology**. . ISSN 1546-1696. 31:3 (2013) 227–9. doi: 10.1038/nbt.2501.

JINEK, Martin; CHYLINSKI, Krzysztof; FONFARA, Ines; HAUER, Michael; DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle - A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**. . ISSN 1095-9203. 337:6096 (2012) 816–21. doi: 10.1126/science.1225829.

KIM, Y. G.; CHANDRASEGARAN, S. - Chimeric restriction endonuclease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 0027-8424. 91:3 (1994) 883–7.

LI, Hojun *et al.* - In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. **Nature**. . ISSN 1476-4687. 475:7355 (2011) 217–21. doi: 10.1038/nature10177.

LI, L.; WU, L. P.; CHANDRASEGARAN, S. - Functional domains in Fok I restriction endonuclease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 0027-8424. 89:10 (1992) 4275–9.

LI, Mo; SUZUKI, Keiichiro; KIM, Na Young; LIU, Guang-Hui; IZPISUA BELMONTE, Juan Carlos - A cut above the rest: targeted genome editing technologies in human pluripotent stem cells. **The Journal of biological chemistry**. . ISSN 1083-351X. 289:8 (2014) 4594–9. doi: 10.1074/jbc.R113.488247.

LI, Ting; HUANG, Sheng; ZHAO, Xuefeng; WRIGHT, David A.; CARPENTER, Susan; SPALDING, Martin H.; WEEKS, Donald P.; YANG, Bing - Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. **Nucleic acids research**. . ISSN 1362-4962. 39:14 (2011) 6315–25. doi: 10.1093/nar/gkr188.

LI, Ting; LIU, Bo; SPALDING, Martin H.; WEEKS, Donald P.; YANG, Bing - High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. **Nature biotechnology**. . ISSN 1546-1696. 30:5 (2012) 390–2. doi: 10.1038/nbt.2199.

LIEBER, Michael R.; GU, Jiafeng; LU, Haihui; SHIMAZAKI, Noriko; TSAI, Albert G. - Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. **Subcellular biochemistry**. . ISSN 0306-0225. 50:2010) 279–96. doi: 10.1007/978-90-481-3471-7\_14.

LIU, Q.; SEGAL, D. J.; GHIARA, J. B.; BARBAS, C. F. - Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 0027-8424. 94:11 (1997) 5525–30.

LOMBARDO, Angelo *et al.* - Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer. **Nature methods**. . ISSN 1548-7105. 8:10 (2011) 861–9. doi: 10.1038/nmeth.1674.

LOMBARDO, Angelo; GENOVESE, Pietro; BEAUSEJOUR, Christian M.; COLLEONI, Silvia; LEE, Ya-Li; KIM, Kenneth A.; ANDO, Dale; URNOV, Fyodor D.; GALLI, Cesare; GREGORY, Philip D.; HOLMES, Michael C.; NALDINI, Luigi - Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. **Nature biotechnology**. . ISSN 1087-0156. 25:11 (2007) 1298–306. doi: 10.1038/nbt1353.

MAEDER, Morgan L. *et al.* - Rapid “open-source” engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. **Molecular cell**. . ISSN 1097-4164. 31:2 (2008) 294–301. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.016.

MALI, Prashant; AACH, John; STRANGES, P. Benjamin; ESVELT, Kevin M.; MOOSBURNER, Mark; KOSURI, Sriram; YANG, Luhan; CHURCH, George M. - CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. **Nature biotechnology**. . ISSN 1546-1696. 31:9 (2013) 833–8. doi: 10.1038/nbt.2675.

MALI, Prashant; ESVELT, Kevin M.; CHURCH, George M. - Cas9 as a versatile tool for engineering biology. **Nature methods**. . ISSN 1548-7105. 10:10 (2013) 957–63. doi: 10.1038/nmeth.2649.

MALI, Prashant; YANG, Luhan; ESVELT, Kevin M.; AACH, John; GUELL, Marc; DICARLO, James E.; NORVILLE, Julie E.; CHURCH, George M. - RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science**. . ISSN 1095-9203. 339:6121 (2013) 823–6. doi: 10.1126/science.1232033.

MENG, Xiangdong; NOYES, Marcus B.; ZHU, Lihua J.; LAWSON, Nathan D.; WOLFE, Scot A. - Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. **Nature biotechnology**. . ISSN 1546-1696. 26:6 (2008) 695–701. doi: 10.1038/nbt1398.

- MILLER, Jeffrey C. *et al.* - A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. **Nature biotechnology**. . ISSN 1546-1696. 29:2 (2011) 143–8. doi: 10.1038/nbt.1755.
- MORBITZER, Robert; ELSAESSER, Janett; HAUSNER, Jens; LAHAYE, Thomas - Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning. **Nucleic acids research**. . ISSN 1362-4962. 39:13 (2011) 5790–9. doi: 10.1093/nar/gkr151.
- MUSSOLINO, Claudio; CATHOMEN, Toni - On target? Tracing zinc-finger-nuclease specificity. **Nature methods**. . ISSN 1548-7105. 8:9 (2011) 725–6. doi: 10.1038/nmeth.1680.
- MUSSOLINO, Claudio; CATHOMEN, Toni - TALE nucleases: tailored genome engineering made easy. **Current opinion in biotechnology**. . ISSN 1879-0429. 23:5 (2012) 644–50. doi: 10.1016/j.copbio.2012.01.013.
- MUSSOLINO, Claudio; MORBITZER, Robert; LÜTGE, Fabienne; DANNEMANN, Nadine; LAHAYE, Thomas; CATHOMEN, Toni - A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. **Nucleic acids research**. . ISSN 1362-4962. 39:21 (2011) 9283–93. doi: 10.1093/nar/gkr597.
- OSBORN, Mark J.; STARKER, Colby G.; MCELROY, Amber N.; WEBBER, Beau R.; RIDDLE, Megan J.; XIA, Lily; DEFEO, Anthony P.; GABRIEL, Richard; SCHMIDT, Manfred; KALLE, Christof VON; CARLSON, Daniel F.; MAEDER, Morgan L.; JOUNG, J. Keith; WAGNER, John E.; VOYTAS, Daniel F.; BLAZAR, Bruce R.; TOLAR, Jakub - TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**. . ISSN 1525-0024. 21:6 (2013) 1151–9. doi: 10.1038/mt.2013.56.
- OUSTEROUT, David G.; PEREZ-PINERA, Pablo; THAKORE, Pratiksha I.; KABADI, Ami M.; BROWN, Matthew T.; QIN, Xiaoxia; FEDRIGO, Olivier; MOULY, Vincent; TREMBLAY, Jacques P.; GERSBACH, Charles A. - Reading frame correction by targeted genome editing restores dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**. . ISSN 1525-0024. 21:9 (2013) 1718–26. doi: 10.1038/mt.2013.111.
- PASTWA, Elzbieta; SOMIARI, Richard I.; MALINOWSKI, Mariusz; SOMIARI, Stella B.; WINTERS, Thomas A. - In vitro non-homologous DNA end joining assays--the 20th anniversary. **The international journal of biochemistry & cell biology**. . ISSN 1878-5875. 41:6 (2009) 1254–60. doi: 10.1016/j.biocel.2008.11.007.
- PATTANAYAK, Vikram; RAMIREZ, Cherie L.; JOUNG, J. Keith; LIU, David R. - Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. **Nature methods**. . ISSN 1548-7105. 8:9 (2011) 765–70. doi: 10.1038/nmeth.1670.
- PAVLETICH, N. P.; PABO, C. O. - Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. **Science**. . ISSN 0036-8075. 252:5007 (1991) 809–17.
- PEREZ-PINERA, Pablo; OUSTEROUT, David G.; BROWN, Matthew T.; GERSBACH, Charles A. - Gene targeting to the ROSA26 locus directed by engineered zinc finger nucleases. **Nucleic acids research**. . ISSN 1362-4962. 40:8 (2012) 3741–52. doi: 10.1093/nar/gkr1214.

PEREZ-PINERA, Pablo; OUSTEROUT, David G.; GERSBACH, Charles A. - Advances in targeted genome editing. **Current opinion in chemical biology**. . ISSN 1879-0402. 16:3-4 (2012) 268–77. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.06.007.

**Phase I Dose Escalation Study of Autologous T-cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases in HIV-Infected Patients - Tabular View - ClinicalTrials.gov** - [Em linha] [Consult. 14 jul. 2014]. Disponível em WWW:<URL:<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01044654>>.

QI, Lei S.; LARSON, Matthew H.; GILBERT, Luke A.; DOUDNA, Jennifer A.; WEISSMAN, Jonathan S.; ARKIN, Adam P.; LIM, Wendell A. - Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. **Cell**. . ISSN 1097-4172. 152:5 (2013) 1173–83. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022.

RIECHMANN, L.; CLARK, M.; WALDMANN, H.; WINTER, G. - Reshaping human antibodies for therapy. **Nature**. . ISSN 0028-0836. 332:6162 (1988) 323–7. doi: 10.1038/332323a0.

SANDER, Jeffry D. *et al.* - Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). **Nature methods**. . ISSN 1548-7105. 8:1 (2011) 67–9. doi: 10.1038/nmeth.1542.

SANDER, Jeffry D.; CADE, Lindsay; KHAYTER, Cyd; REYON, Deepak; PETERSON, Randall T.; JOUNG, J. Keith; YEH, Jing-Ruey J. - Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. **Nature Biotechnology**. . ISSN 1087-0156. 29:8 (2011) 697–698. doi: 10.1038/nbt.1934.

SCHOLZE, Heidi; BOCH, Jens - TAL effectors are remote controls for gene activation. **Current opinion in microbiology**. . ISSN 1879-0364. 14:1 (2011) 47–53. doi: 10.1016/j.mib.2010.12.001.

SEBASTIANO, Vittorio; MAEDER, Morgan L.; ANGSTMANN, James F.; HADDAD, Bahareh; KHAYTER, Cyd; YEO, Dana T.; GOODWIN, Mathew J.; HAWKINS, John S.; RAMIREZ, Cherie L.; BATISTA, Luis F. Z.; ARTANDI, Steven E.; WERNIG, Marius; JOUNG, J. Keith - In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. **Stem cells (Dayton, Ohio)**. . ISSN 1549-4918. 29:11 (2011) 1717–26. doi: 10.1002/stem.718.

SEGAL, D. J.; DREIER, B.; BEERLI, R. R.; BARBAS, C. F. - Toward controlling gene expression at will: Selection and design of zinc finger domains recognizing each of the 5'-GNN-3' DNA target sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. . ISSN 0027-8424. 96:6 (1999) 2758–2763. doi: 10.1073/pnas.96.6.2758.

SEGAL, David J.; MECKLER, Joshua F. - Genome engineering at the dawn of the golden age. **Annual review of genomics and human genetics**. . ISSN 1545-293X. 14:2013) 135–58. doi: 10.1146/annurev-genom-091212-153435.

SHIMIZU, Yuka; BHAKTA, Mital S.; SEGAL, David J. - Restricted spacer tolerance of a zinc finger nuclease with a six amino acid linker. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**. . ISSN 1464-3405. 19:14 (2009) 3970–2. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.02.109.



SHUKLA, Vipula K. *et al.* - Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. **Nature**. . ISSN 1476-4687. 459:7245 (2009) 437–41. doi: 10.1038/nature07992.

SMITH, J.; BIBIKOVA, M.; WHITBY, F. G.; REDDY, A. R.; CHANDRASEGARAN, S.; CARROLL, D. - Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. **Nucleic acids research**. . ISSN 1362-4962. 28:17 (2000) 3361–9.

SMITH, Joseph R.; MAGUIRE, Sean; DAVIS, Lesley A.; ALEXANDER, Morgan; YANG, Fentang; CHANDRAN, Siddharthan; FFRENCH-CONSTANT, Charles; PEDERSEN, Roger A. - Robust, persistent transgene expression in human embryonic stem cells is achieved with AAVSI-targeted integration. **Stem cells (Dayton, Ohio)**. . ISSN 1549-4918. 26:2 (2008) 496–504. doi: 10.1634/stemcells.2007-0039.

SOLDNER, Frank *et al.* - Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. **Cell**. . ISSN 1097-4172. 146:2 (2011) 318–31. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.019.

**Study of Autologous T-cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases in HIV-Infected Subjects - Tabular View - ClinicalTrials.gov** - [Em linha] [Consult. 14 jul. 2014]. Disponível em WWW:<URL:<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01252641>>.

SUNG, Patrick; KLEIN, Hannah - Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. **Nature reviews. Molecular cell biology**. . ISSN 1471-0072. 7:10 (2006) 739–50. doi: 10.1038/nrm2008.

SZCZEPEK, Michal; BRONDANI, Vincent; BÜCHEL, Janine; SERRANO, Luis; SEGAL, David J.; CATHOMEN, Toni - Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. **Nature biotechnology**. . ISSN 1087-0156. 25:7 (2007) 786–93. doi: 10.1038/nbt1317.

TERNS, Michael P.; TERNS, Rebecca M. - CRISPR-based adaptive immune systems. **Current opinion in microbiology**. . ISSN 1879-0364. 14:3 (2011) 321–7. doi: 10.1016/j.mib.2011.03.005.

TESSON, Laurent; USAL, Claire; MÉNORET, Séverine; LEUNG, Elo; NILES, Brett J.; REMY, Séverine; SANTIAGO, Yolanda; VINCENT, Anna I.; MENG, Xiangdong; ZHANG, Lei; GREGORY, Philip D.; ANEGON, Ignacio; COST, Gregory J. - Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. **Nature biotechnology**. . ISSN 1546-1696. 29:8 (2011) 695–6. doi: 10.1038/nbt.1940.

TORIKAI, Hiroki *et al.* - A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. **Blood**. . ISSN 1528-0020. 119:24 (2012) 5697–705. doi: 10.1182/blood-2012-01-405365.

TOWNSEND, Jeffrey A.; WRIGHT, David A.; WINFREY, Ronnie J.; FU, Fengli; MAEDER, Morgan L.; JOUNG, J. Keith; VOYTAS, Daniel F. - High-frequency modification of plant

genes using engineered zinc-finger nucleases. **Nature**. . ISSN 1476-4687. 459:7245 (2009) 442–5. doi: 10.1038/nature07845.

URNOV, Fyodor D.; MILLER, Jeffrey C.; LEE, Ya-Li; BEAUSEJOUR, Christian M.; ROCK, Jeremy M.; AUGUSTUS, Sheldon; JAMIESON, Andrew C.; PORTEUS, Matthew H.; GREGORY, Philip D.; HOLMES, Michael C. - Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. **Nature**. . ISSN 1476-4687. 435:7042 (2005) 646–51. doi: 10.1038/nature03556.

URNOV, Fyodor D.; REBAR, Edward J.; HOLMES, Michael C.; ZHANG, H. Steve; GREGORY, Philip D. - Genome editing with engineered zinc finger nucleases. **Nature reviews. Genetics**. . ISSN 1471-0064. 11:9 (2010) 636–46. doi: 10.1038/nrg2842.

WANG, Haoyi; YANG, Hui; SHIVALILA, Chikdu S.; DAWLATY, Meelad M.; CHENG, Albert W.; ZHANG, Feng; JAENISCH, Rudolf - One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. **Cell**. . ISSN 1097-4172. 153:4 (2013) 910–8. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.025.

WIEDENHEFT, Blake; STERNBERG, Samuel H.; DOUDNA, Jennifer A. - RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. **Nature**. . ISSN 1476-4687. 482:7385 (2012) 331–8. doi: 10.1038/nature10886.

WILKINSON, Royce; WIEDENHEFT, Blake - A CRISPR method for genome engineering. **F1000prime reports**. . ISSN 2051-7599. 6:January (2014) 3. doi: 10.12703/P6-3.

WOOD, Andrew J.; LO, Te-Wen; ZEITLER, Bryan; PICKLE, Catherine S.; RALSTON, Edward J.; LEE, Andrew H.; AMORA, Rainier; MILLER, Jeffrey C.; LEUNG, Elo; MENG, Xiangdong; ZHANG, Lei; REBAR, Edward J.; GREGORY, Philip D.; URNOV, Fyodor D.; MEYER, Barbara J. - Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. **Science**. . ISSN 1095-9203. 333:6040 (2011) 307. doi: 10.1126/science.1207773.

YIN, Hao; XUE, Wen; CHEN, Sidi; BOGORAD, Roman L.; BENEDETTI, Eric; GROMPE, Markus; KOTELIANSKY, Victor; SHARP, Phillip A; JACKS, Tyler; ANDERSON, Daniel G. - Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. **Nature biotechnology**. . ISSN 1546-1696. March (2014) 7–10. doi: 10.1038/nbt.2884.

YUSA, Kosuke *et al.* - Targeted gene correction of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. **Nature**. . ISSN 1476-4687. 478:7369 (2011) 391–4. doi: 10.1038/nature10424.

ZOU, Jizhong; MALI, Prashant; HUANG, Xiaosong; DOWEY, Sarah N.; CHENG, Linzhao - Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. **Blood**. . ISSN 1528-0020. 118:17 (2011) 4599–608. doi: 10.1182/blood-2011-02-335554.

ZU, Yao; TONG, Xiangjun; WANG, Zhanxiang; LIU, Da; PAN, Ruochuan; LI, Zhe; HU, Yingying; LUO, Zhou; HUANG, Peng; WU, Qian; ZHU, Zuoyan; ZHANG, Bo; LIN, Shuo - TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. **Nature methods**. . ISSN 1548-7105. 10:4 (2013) 329–31. doi: 10.1038/nmeth.2374.