

# IMPLEMENTANDO CRISPR/Cas9 NO LABORATÓRIO: UM GUIA DE COMO EDITAR CÉLULAS PARA CRIAR MODELOS CELULARES

## *A COMPREHENSIVE GUIDE TO GENERATING CELL MODELS IN THE LAB USING CRISPR/Cas9*

Edina Poletto<sup>1,2</sup> , Roselena Silvestri Schuh<sup>2,3</sup> , Guilherme Baldo<sup>2</sup> 

### RESUMO

Modelos celulares são muito utilizados na pesquisa experimental e, idealmente, constituem o primeiro nível de modelo de estudo. A utilização de modelos celulares permite, por exemplo, a primeira avaliação de tolerabilidade e de segurança de fármacos e tratamentos experimentais, além de permitir a redução do uso de animais de experimentação. Muito conhecimento já foi gerado cultivando células de pacientes com patologias diversas – de doenças genéticas hereditárias a câncer. Entretanto, muitos pesquisadores não têm acesso às células de pacientes. O desenvolvimento da técnica de edição de genes CRISPR/Cas9, na última década, tornou a geração de modelos celulares muito mais acessível para pesquisadores do mundo todo, por permitir a edição de genes de interesse em múltiplos tipos celulares, incluindo células imortalizadas e de fácil cultivo. Nesse contexto, este artigo descreve como a edição gênica funciona e como utilizar essa ferramenta *in vitro* para produzir modelos celulares para estudo. Nosso objetivo é apresentar essa metodologia a laboratórios que tenham interesse em implementar edição genômica em seus projetos de pesquisa.

**Palavras-chave:** Edição gênica, edição genômica, CRISPR/Cas9, edição de DNA, modelos celulares, linhagens celulares, knockout, engenharia genética, geração de nocaute, transfecção.

### ABSTRACT

Cellular models are extensively utilized in experimental research and serve as the primary level of study. These models enable the initial assessment of drug and treatment tolerability and safety, while also reducing the need for experimental animals. Significant knowledge has been acquired by cultivating cells from patients with various pathologies, ranging from hereditary genetic disorders to cancer. However, access to such cells is limited for many researchers. The advent of the CRISPR/Cas9 gene editing technique in the past decade has revolutionized the generation of cellular models, making it more accessible to researchers worldwide. This technique allows for the targeted editing of genes of interest in multiple cell types, including immortalized cells. This manuscript aims to provide a comprehensive overview of gene editing, while also being a guide for conducting initial experiments, with a primary focus on the development of cell models. Our primary goal is to introduce these techniques to labs in Brazil that are not familiar with them.

**Keywords:** Gene editing, genome editing, CRISPR/Cas9, DNA editing, cell models, cell lines, knockout, genetic engineering, knockout models, transfection.

*Clin Biomed Res.* 2023;43(4):423-438

1 Department of Pediatrics, Stanford University School of Medicine. Stanford, CA, Estados Unidos.

2 Laboratório Células, Tecidos e Genes, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS, Brasil.

3 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil.

#### Autor correspondente:

Edina Poletto  
epoletto@stanford.edu;  
edinapoletto@gmail.com  
Department of Pediatrics, Stanford University  
265 Campus Drive, G2055.  
Lorry Lokey Stem Cell Building  
94305, Stanford, CA, Estados Unidos.

## PARTE 1: SOBRE O CRISPR/CAS9

### CRISPR/Cas9

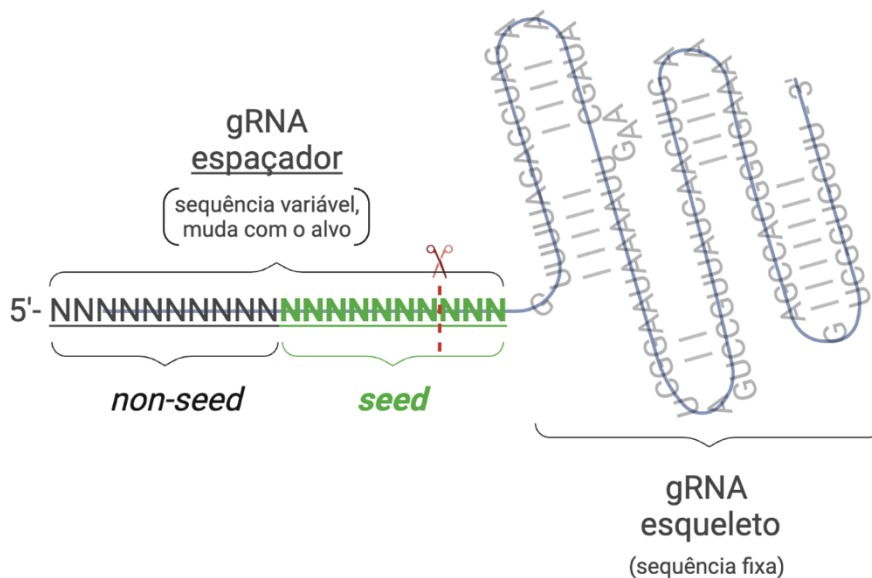
A edição genômica por CRISPR/Cas9 revolucionou a pesquisa biotecnológica, pois permite que qualquer laboratório no mundo modifique genes com mais facilidade e menor custo do que as alternativas anteriormente disponíveis. A ferramenta utiliza apenas dois componentes: uma nuclease Cas9, que cliva a fita dupla de DNA, e o RNA guia (gRNA), que é complementar ao local de interesse no genoma e direciona a Cas9 ao sítio de edição. Uma vez no local específico, o complexo gRNA-Cas9 cliva a fita dupla de DNA. As quebras geradas nas duas fitas são altamente danosas para a célula, que se encarrega de reparar o dano imediatamente. Esse reparo pode ocorrer por dois processos principais: junção terminal não-homóloga (do inglês *non-homologous end joining*, NHEJ) e reparo direcionado por homologia (*homology-directed repair*, HDR). O NHEJ pode induzir pequenas mutações no local da clivagem quando a demanda por reparo é alta; já o HDR utiliza uma sequência homóloga como molde para realizar o reparo. Em células em divisão, quando o HDR é mais ativo, o molde utilizado é a cromátide-irmã. Nos protocolos de edição, a sequência de DNA que será utilizada como molde é fornecida à célula (geralmente introduzida junto com a Cas9 e o gRNA) e contém a alteração de interesse flanqueada por sequências

homólogas ao ponto de edição no genoma. Ou seja, para induzir mutações aleatórias, só são necessários dois componentes (gRNA e Cas9); para editar sequências com precisão, são necessários três (gRNA, Cas9 e sequência molde com homologia)<sup>1</sup>. Mais detalhes sobre a origem do CRISPR/Cas9, sua estrutura e suas aplicações podem ser encontrados em diversos artigos de revisão na literatura<sup>1-4</sup>.

### O RNA guia

#### Estrutura da molécula para edição genômica

De modo simplificado, o gRNA desenvolvido para edição genômica possui duas partes: um esqueleto (ou *scaffold*) de sequência fixa, que é responsável por recrutar a nuclease e por estabilizar o complexo, e uma sequência espaçadora (ou *spacer*), composta de 20 nucleotídeos (nt) variáveis, que é responsável por reconhecer o alvo e direcionar a nuclease ao ponto de clivagem. A sequência espaçadora ainda é dividida entre *seed* e *non-seed*. A primeira tem de 10 – 12 nt e corresponde à porção mais próxima à extremidade 3'; essa porção é crítica ao reconhecimento do alvo e à atividade do sistema, requerendo completa complementariedade entre a sequência e o alvo. A região *non-seed*, por outro lado, localiza-se na extremidade 5' do gRNA e permite alguns desemparelhamentos (*mismatches*) sem impacto considerável na edição<sup>1</sup>. A Figura 1 ilustra as características do gRNA.



**Figura 1:** Estrutura do RNA guia (gRNA) utilizado para edição genômica no sistema CRISPR/Cas9.

Nota: O gRNA é uma molécula de RNA com aproximadamente 100 nucleotídeos, composta por uma sequência fixa chamada de esqueleto (ou *scaffold*, em inglês) e uma sequência de 20 nucleotídeos que é complementar ao local do genoma a ser editado, chamada de espaçador (ou *spacer*, em inglês; sublinhado na figura). Esta sequência espaçadora, portanto, é variável e é desenhada de acordo com o experimento. Ela ainda é subdividida em *seed* (em verde) e *non-seed* (em preto).

Fonte: Criado com BioRender.com.

### Desenho do gRNA

O desenho do gRNA também deve levar em consideração o objetivo do projeto – a edição é para nocautear um gene (independente da alteração induzida), ou é para modificar sequências com precisão (como inserir genes ou induzir mutações específicas)? No primeiro caso, a sequência do gRNA será mais importante do que a sua localização, porque buscamos o guia mais eficiente que tenha como alvo o gene de interesse (independentemente de o guia reconhecer o éxon 1 ou o éxon 5, por exemplo). Por outro lado, para induzir alterações específicas, o local onde o gRNA anela no genoma é fundamental e deve ser priorizada. Isso se deve à necessidade de induzir a clivagem do genoma o mais próximo o possível do local da edição. Se a distância entre o ponto de clivagem e a mutação a ser introduzida for de 10 nt, a eficiência de edição cai para aproximadamente a metade dos alelos e para apenas 20% de edições bialélicas, em comparação a 1 nt de distância; se a distância da clivagem for de 30 nt do ponto da mutação, a eficiência de edições bialélicas é praticamente nula. Entretanto, se o objetivo for introduzir alterações em

heterozigose, o ponto de clivagem idealmente deve ser entre 5 a 20 nt distante da mutação<sup>5,6</sup>.

Para nocautear genes, deve-se evitar as sequências que codificam o início e o final da proteína, pois códons de iniciação e terminação alternativos poderão ser utilizados e interferir no produto. Além disso, uma opção para aumentar a eficiência do sistema é utilizar múltiplos gRNAs próximos, que induzirão a deleção da sequência entre os seus pontos de clivagem<sup>7</sup>.

### Ferramentas para desenhar o gRNA

Existem múltiplas ferramentas online para o desenho do gRNA, conforme a Tabela 1 demonstra. Em geral, são ferramentas simples, em que o usuário escolhe o genoma da espécie (humano, camundongo, etc.), o gene de interesse e a modificação desejada. Para selecionar o gene, é possível indicar o número da sequência de referência do mesmo, ou as inserir manualmente. Caso a última opção seja escolhida, deve-se inserir a sequência dos éxons e não a sequência genômica (porque pode desenhar guias em íntrons) e tampouco o cDNA (porque pode desenhar guias nas junções éxon-éxon, que serão inativos no genoma).

Tabela 1: Exemplos de ferramentas online para desenhar o gRNA.

Ferramenta	Website
ATUM CRISPR gRNA Design tool	<a href="https://www.atum.bio/eCommerce/cas9/input">https://www.atum.bio/eCommerce/cas9/input</a>
Benchling CRISPR Guide RNA Design	<a href="https://www.benchling.com/crispr/">https://www.benchling.com/crispr/</a>
Cas-OFFinder	<a href="http://www.rgenome.net/cas-offinder/">http://www.rgenome.net/cas-offinder/</a>
CHOP-CHOP	<a href="https://chopchop.cbu.uib.no/">https://chopchop.cbu.uib.no/</a>
CRISPick	<a href="https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public">https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public</a>
CRISPOR	<a href="http://crispor.tefor.net/">http://crispor.tefor.net/</a>
CRISPR-ERA	<a href="http://crispr-era.stanford.edu/">http://crispr-era.stanford.edu/</a>
E-CRISP	<a href="http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html">http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html</a>
GenScript CRISPR sgRNA Design Tool	<a href="https://www.genscript.com/gRNA-design-tool.html">https://www.genscript.com/gRNA-design-tool.html</a>
IDT CRISPR-Cas9 guide RNA	<a href="https://www.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM">https://www.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM</a>
Invitrogen TrueDesign Genome Editor	<a href="https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/genome-editing/invitrogen-truedesign-genome-editor.html">https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/genome-editing/invitrogen-truedesign-genome-editor.html</a>
Off-Spotter	<a href="https://cm.jefferson.edu/Off-Spotter/">https://cm.jefferson.edu/Off-Spotter/</a>
Synthego CRISPR Design Tool	<a href="https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-design-tool">https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-design-tool</a>
CRISPRDB	<a href="https://crisprdb.org/">https://crisprdb.org/</a>

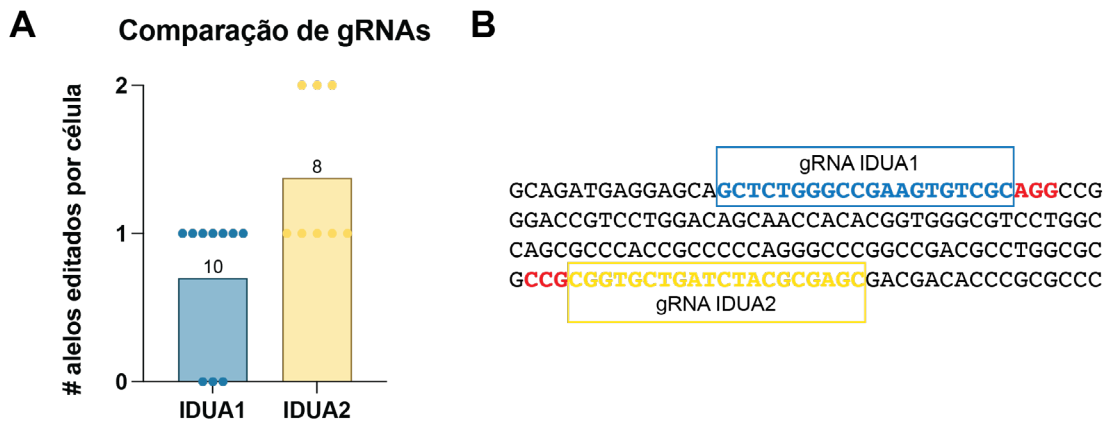
Independente da ferramenta utilizada, é sempre recomendado escolher a sequência com maior score no alvo e menor número de *off-targets*, ou seja, de possível atividade fora do alvo. Também é interessante utilizar mais de uma ferramenta, pois frequentemente os programas de predição apresentam resultados discordantes. Entretanto, a eficiência predita por esses programas, mesmo quando concordantes, nem sempre corrobora o que é visto experimentalmente<sup>8</sup>.

### Eficiência

A eficiência de um guia vai depender não só da sua sequência intrínseca, mas também da estrutura

secundária do alvo no genoma, que inclui o estado da cromatina, a presença de proteínas associadas, etc.<sup>8</sup>. Sendo assim, cada guia é único e terá atividade diferente, podendo variar consideravelmente mesmo que sejam sequências adjacentes. Por isso, sempre que possível, é indicado que se teste mais de um gRNA para cada alvo de interesse. Guias ineficientes tornarão todo o processo mais dispendioso.

Na Figura 2, apresentamos dois gRNAs cuja atividade foi determinada experimentalmente. Observe como a eficiência dos guias (estimada a partir da quantidade de inserções e deleções (*indels*) geradas) varia (Figura 2A), mesmo ligando no alvo a apenas 90 pb distantes entre si (Figura 2B).



**Figura 2:** Comparação da eficiência de indução de mutações com guias diferentes.

A: No gene *IDUA*, o guia IDUA1 gerou *indels* em apenas 35% dos alelos analisados (20 no total) e não produziu nenhuma célula com alteração bialélica; já o guia IDUA2 gerou *indels* em 70% dos alelos, sendo que nenhum clone permaneceu sem *indels* e três tinham edição bialélica. Para este experimento, células HEK293 foram submetidas à edição e isoladas para obtenção de clones únicos. Cada ponto representa um clone e o número acima das barras representa o número de clones analisados para cada condição. Dados determinados experimentalmente; B: Localização dos guias no gene *IDUA*, que estão somente 90 pb distantes entre si. A sequência PAM está representada em vermelho.

### Quantificando as *indels* para verificar a eficiência do sistema

A quantidade de *indels* introduzidas no alvo é uma medida indireta da eficiência de clivagem do sistema. Quanto mais o sistema induzir a quebra no alvo, maior é a chance de o reparo por NHEJ introduzir alterações na sequência. Assim, para sabermos a atividade de um gRNA, podemos simplesmente quantificar a frequência de *indels* presentes na população de células submetidas à edição, sem a necessidade de isolar clones e sequenciá-los individualmente. Guias eficientes não só introduzirão *indels* mais facilmente, como também permitirão uma edição precisa utilizando sequências doadoras para o reparo direcionado por recombinação. Portanto, quanto mais clivagens ocorrerem, mais edição ocorrerá, independente do mecanismo.

Testar diferentes guias para o mesmo alvo e avaliar a eficiência de cada um pode ser uma boa estratégia. Para isso, basta editar grupos de células separadamente com cada um dos guias, aguardar 48 a 72 h (para dar tempo suficiente de a edição ocorrer), extrair e sequenciar o DNA de parte das células, e quantificar as *indels* presentes no alvo, que é feita por programas de análise de decomposição de sequências (Figura 3A).

Para fazer essa análise, primeiro é necessário desenhar primers para amplificar a região de interesse. Os programas de análise recomendam, em geral, amplicons de 700 pb que contenham a região da edição, aproximadamente, no meio do amplicon. Assim, no sequenciamento, haverá uma região à montante da edição que terá a mesma sequência em todas as moléculas de DNA e apresentará uma aparência “limpa” no cromatograma, e uma porção

após o ponto da edição que conterá sequências diversas decorrentes da edição, com uma aparência “bagunçada” (Figura 3B).

Essas ferramentas, como o TIDE (<https://tide.nki.nl>) ou o ICE (<https://ice.synthego.com>) comparam a quantidade de sequências diferentes e a proporção delas em relação à sequência selvagem, de acordo com o tamanho e a posição dos picos no cromatograma. Por isso, é importante que se tenha sequenciamentos com picos únicos e com, pelo menos, 200 pares de base inalterados antes do ponto da edição. Esses programas também nos fornecem a porcentagem de *indels* detectada (Figura 3C-D) e podemos utilizar esse número como a medida indireta de clivagem de um guia. Assim, ao testarmos vários guias, escolhemos aquele que apresenta a maior geração de *indels* (e, portanto, maior clivagem).

A ferramenta ICE ([ice.synthego.com](https://ice.synthego.com)) também fornece um escore de nocaute (*KO score*), que informa qual proporção das *indels* geradas são potencialmente nocauteadoras, por serem inserções ou deleções de nucleotídeos não múltiplos de 3 e, portanto, alterações fora de fase (ou *frameshift*).

No exemplo I (Figura 3B), a sequência antes do local da quebra (sinalizado pela linha pontilhada) está bem clara, com picos únicos. Após o ponto da quebra, vários picos surgem, de tamanhos variados e com posições apresentando até as 4 bases. Isso acontece porque existem múltiplas *indels* ocasionadas e cada sequência vai apresentar um perfil de picos distinto. Por outro lado, no exemplo II, observamos apenas duas sequências distintas após o ponto de edição. Isso porque uma mesma mutação (duplicação de 1 A) predominou nos eventos de *indels* gerados.

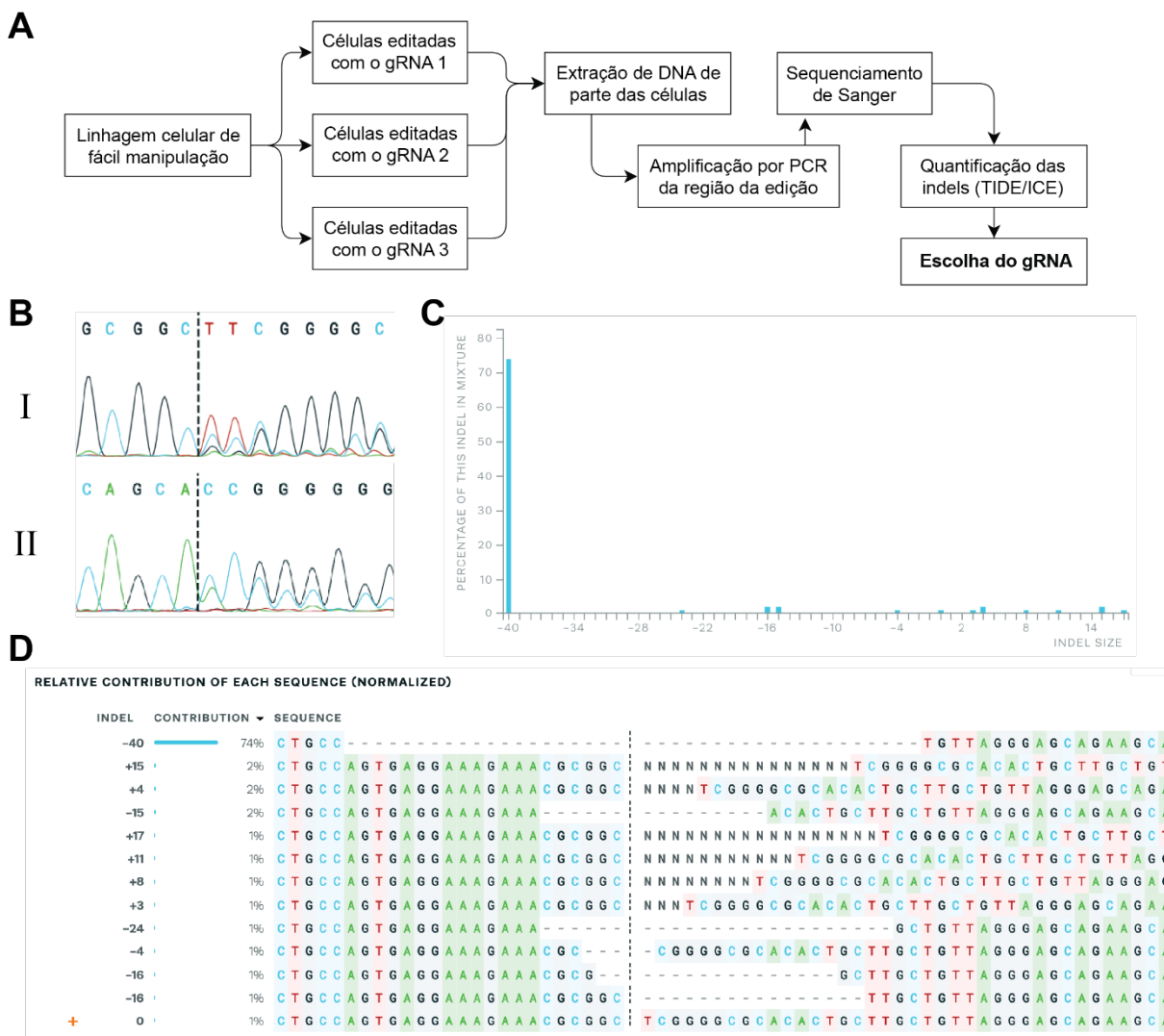


Figura 3: Analisando a eficiência de clivagem do gRNA.

A: Etapas para escolher o gRNA mais eficiente (ou seja, o que induz mais clivagens e, conseqüentemente, *indels*, no alvo); B: Cromatogramas gerados pelo sequenciamento de Sanger, por meio dos quais é possível observar a presença de múltiplas seqüências (evidenciadas por sobreposição de picos) após o ponto de clivagem previsto para cada gRNA (representado pela linha pontilhada); C: Geralmente, há predomínio de uma *indel*, mas muitas seqüências diferentes podem ser produzidas; D: A proporção de seqüências alteradas em relação à seqüência selvagem (ou seja, a porcentagem de *indels* na população) corresponde à medida indireta de eficiência do gRNA. C e D representam exemplos de resultados de uma análise feita na ferramenta ICE, que mostra o perfil e a frequência (ou contribuição) de todas *indels* identificadas na população analisada.

Essa análise pode ser usada não somente para determinar a eficiência da clivagem do gRNA, mas também para caracterizar a população editada e para tomada de decisões no fluxo de geração do modelo. Considere hipoteticamente que uma população de células foi submetida à edição no dia 0. No dia 2, uma parte das células foi coletada e a análise de decomposição de *indels* foi feita, apresentando 20% de *indels*. As células foram mantidas em cultivo e, no dia 10, a análise de decomposição foi refeita, acusando uma proporção de *indels* de 70%.

Nesse caso, a edição pode estar conferindo uma vantagem seletiva para essas células, que estão dominando a população. Se o objetivo for obter uma população editada (independente do genótipo), basta manter essas células em cultivo que, eventualmente, todas as células serão editadas/nocautes. Por outro lado, o contrário também poderá acontecer – se o gene for fundamental para a sobrevivência ou proliferação celular e for nocauteado pelas *indels* geradas, as células editadas podem estar morrendo, ou podem estar proliferando mais lentamente que



células não editadas, e serão eventualmente perdidas, caso sejam mantidas em cultivo.

Em casos em que o melhor gRNA já foi escolhido e, mesmo assim, a eficiência da edição é pequena, pode-se fazer múltiplos ciclos de edição para aumentar a proporção de células editadas antes de realizar o isolamento e a expansão clonal, aumentando a chance de se obter um clone editado. Entre os ciclos, é interessante fazer a análise de decomposição para avaliar o incremento de edição a cada ciclo e se há edição o suficiente para fazer o isolamento clonal, caso esta etapa esteja no escopo do projeto.

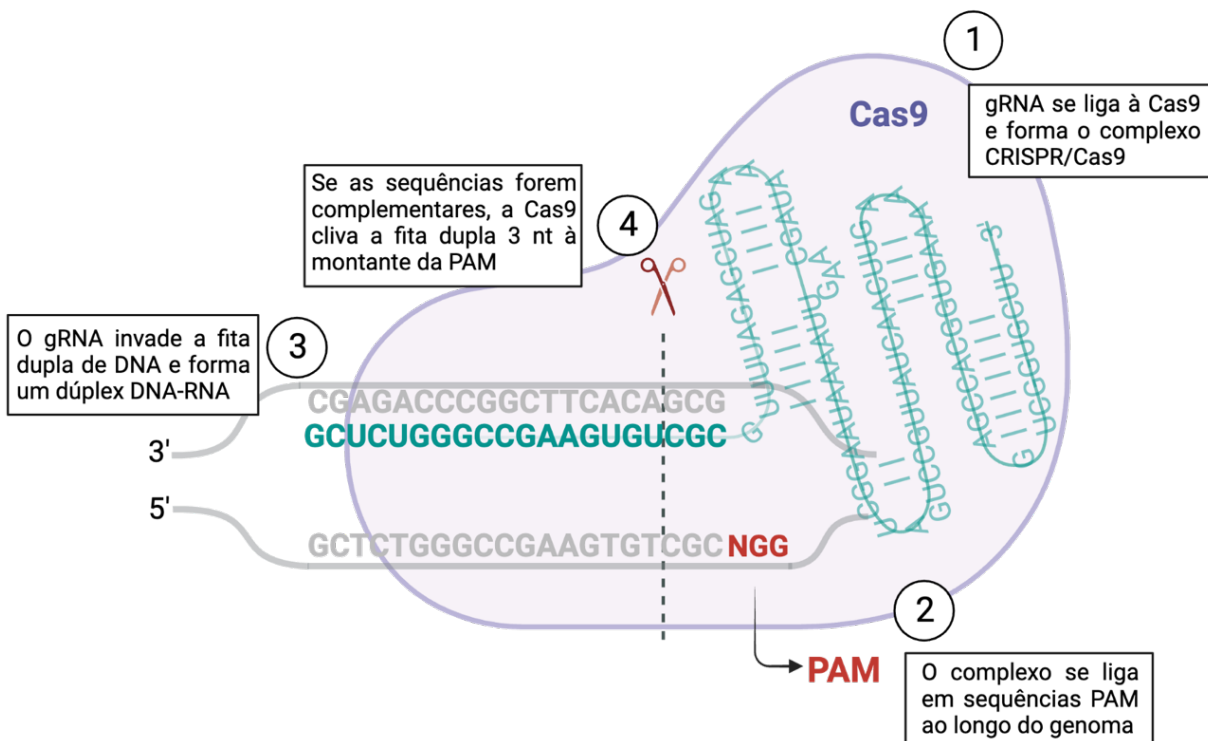
Entretanto, vale ressaltar que a análise das sequências da população mista pode superestimar o número de clones editados, isolados e viáveis. Usher e colaboradores<sup>9</sup> obtiveram apenas 1 % de clones editados por recombinação direcionada por homologia, embora a previsão pela análise da população mista era de 12 %.

### Cas9 e a sequência PAM

A sequência PAM (do inglês *protospacer adjacent motif*, ou motivo adjacente ao protoespaçador)

é uma sequência de reconhecimento do complexo gRNA-Cas9. O complexo rastreia o genoma em busca desta sequência e, a cada PAM encontrada, ele interroga a sequência adjacente em busca de complementariedade com o gRNA. Quando a sequência complementar é encontrada, a Cas9 dissocia as fitas de DNA no genoma e há a invasão do gRNA para formar um dúplex DNA-RNA (Figura 4). Com a complementariedade perfeita, a Cas9 cliva a dupla fita de DNA 3 pb à montante da PAM. Ou seja, a sequência PAM é encontrada no genoma, no alvo, e não no complexo CRISPR-Cas9. Portanto, ao desenhar o gRNA, os 20 nt não devem incluir a PAM<sup>1</sup>.

A PAM varia de acordo com a Cas e com a espécie. A Cas mais utilizada é a Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpyCas9 ou SpCas9) e a sequência PAM reconhecida por ela é “NGG”. Consequentemente, só é possível realizar uma edição por CRISPR/Cas9 usando SpCas9 em locais onde há uma sequência NGG adjacente. Na ausência de NGG no alvo, é possível utilizar outros sistemas, uma vez que outras Cas reconhecem sequências PAM diferentes (Tabela 2).



**Figura 4:** Estrutura e ação do complexo CRISPR/Cas9.

1: O esqueleto do gRNA se liga à Cas9, formando um complexo; 2: Esse complexo percorre o genoma e, a cada sequência PAM (em vermelho) encontrada, ele se liga ao DNA, invadindo a fita dupla; 3: A partir daí, busca o pareamento entre sua sequência no gRNA e a sequência no genoma. Se a sequência não for complementar, o complexo se dissocia do genoma e busca um novo alvo; 4: Se a sequência for complementar, o complexo se estabiliza e a Cas9 cliva a fita dupla de DNA à montante da sequência PAM.

Fonte: Criado com BioRender.com.

**Tabela 2:** Tipos de Cas mais utilizadas em protocolos de edição e suas diferentes sequências PAM.

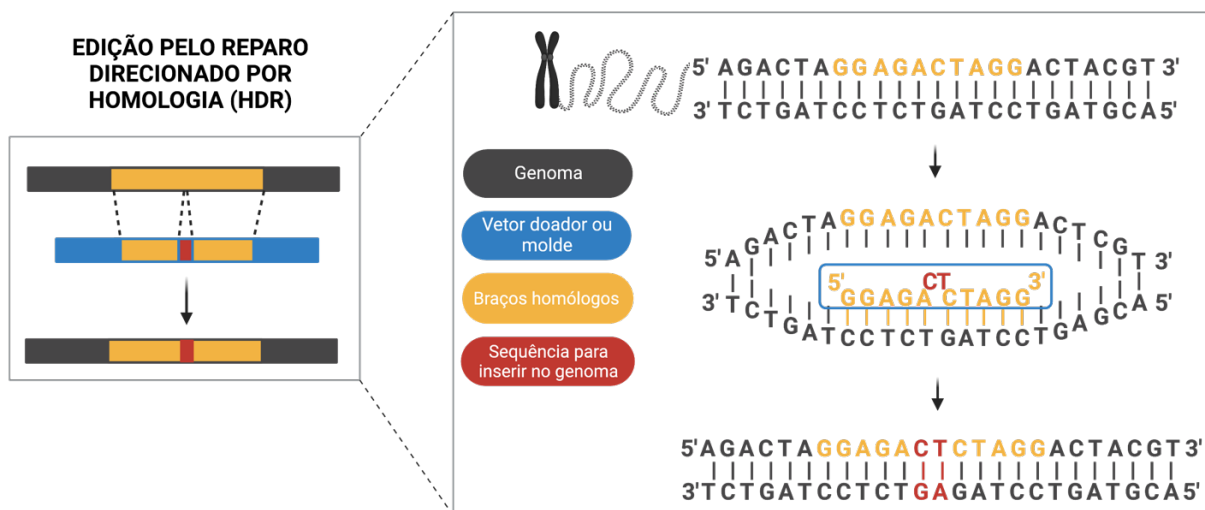
Nuclease	Organismo de origem	Sequência PAM (5'- 3')
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i>	NGG
SaCas9	<i>Staphylococcus aureus</i>	NGRRT or NGRRN
NmeCas9	<i>Neisseria meningitidis</i>	NNNNGATT
CjCas9	<i>Campylobacter jejuni</i>	NNNNRYAC
StCas9	<i>Streptococcus thermophilus</i>	NNAGAAW
LbCpf1 (Cas12a)	<i>Lachnospiraceae</i> bacterium	TTTV
AsCpf1 (Cas12a)	<i>Acidaminococcus</i> sp.	TTTV
AacCas12b	<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	TTN
BhCas12b v4	<i>Bacillus hisashii</i>	ATTN, TTTN e GTTN
Cas14	<i>Uncultivated archaea</i>	Sequências ricas em T, ex. TTTA
Cas3	análise <i>in silico</i> de vários genomas de procariotos	Não necessita de PAM

Fonte: synthego.com

### DNA molde ou sequência homóloga

Para geração de *knock-ins* (termo em inglês que se refere à inserção de sequências em um genoma), é necessário fornecer à célula uma molécula de DNA contendo a alteração de interesse, que chamamos de sequência doadora ou sequência molde. Essa sequência molde pode ter tamanho variável – que pode inserir de um a milhares de pares de bases – e deve conter sequências com homologia

ao local de edição no genoma, os chamados *braços homólogos*. Esses braços homólogos têm a função de anelar ao sítio de edição e servir como molde para que o sistema de reparo celular o utilize como modelo para reparar a fita clivada (Figura 5). As possibilidades de edição utilizando esse mecanismo são múltiplas, e incluem inserir genes inteiros, promover excisão de éxons específicos, deletar sequências e corrigir mutações de ponto, por exemplo<sup>10</sup>.



**Figura 5:** Inserção precisa de sequências de DNA no genoma pelo reparo direcionado por homologia (HDR).

Nota: Para que o reparo direcionado por homologia ocorra, como o nome já diz, é necessária a presença de uma sequência homóloga ao local de edição no genoma, isto é, sequências complementares que vão se anelar ao genoma. Após a indução da quebra da fita dupla de DNA pelo CRISPR/Cas9, a célula busca sequências homólogas para usar como modelo e reparar o DNA. Quando sequências extras são propositalmente inseridas entre os braços homólogos, é possível “enganar” o sistema de reparo e fazer com que ele inclua essas sequências no genoma, cimentando a modificação.

Fonte: Criado com BioRender.com.

O tamanho da sequência a ser introduzida no genoma é o maior determinante no momento de desenhar o molde e escolher o vetor de entrega, uma vez que alguns vetores têm limite de carga. O tamanho dessa sequência molde também vai interferir na eficiência do processo.

No caso de mutações de ponto, a sequência doadora deve ser completamente homóloga ao genoma, exceto na base correspondente à mutação de interesse. Nesses casos de edição de poucos nucleotídeos, é recomendado utilizar oligonucleotídeos de fita simples (ssODN) de até 100 nt de comprimento,

contendo aproximadamente 40 nt de homologia em cada extremidade<sup>11</sup>. Para inserir sequências maiores, de centenas de nucleotídeos, podem ser utilizados plasmídeos e vetores virais. O tamanho dos braços homólogos nesses casos ainda é controverso, mas estima-se que cada braço deva ter, em geral, 50 % do tamanho da sequência a ser introduzida no genoma, ou no mínimo 500 pb para sequências acima de 1000 pb. Embora a utilização de braços homólogos menores que 500 pb seja possível, a eficiência do processo pode diminuir<sup>12</sup>. Em resumo, recomenda-se braços homólogos de cerca de 50 pb para edições pequenas (< 10 pb) e em torno de 200 a 500 pb para inserção de sequências grandes, de centenas de bases (como inserção de genes, por exemplo). Em desenhos experimentais simples, alguns dos programas para desenho de gRNA mencionados na Tabela 1 também fornecem sugestões de sequências molde para recombinação.

Outra questão muito importante a ser considerada é que, por conter a sequência praticamente idêntica ao genoma e ao gRNA, a sequência doadora pode ser clivada pelo complexo CRISPR/Cas9. Inclusive, uma vez que a edição tenha ocorrido corretamente no genoma, o CRISPR poderá clivar novamente a fita já editada, que poderá ser reparada por NHEJ e gerar *indels* no local. Portanto, para evitar tanto a clivagem do vetor doador quanto a clivagem dos alelos já eficientemente

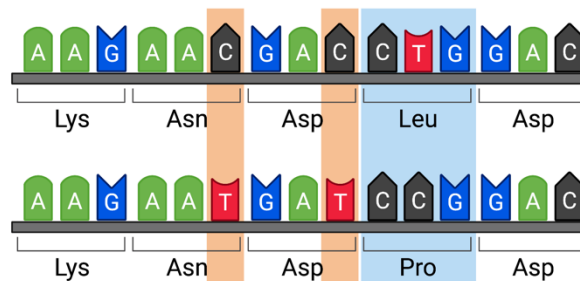
editados, é interessante inserir mutações (silenciosas para sequências codificantes) na sequência doadora (Figura 6). A maneira mais significativa de aumentar a eficiência de *knock-in* é inserindo mutações silenciosas 1) na sequência PAM, 2) o mais próximo da PAM o possível e 3) inserindo mais de uma alteração<sup>13</sup>.

Considere o exemplo da Figura 6. O objetivo é substituir um T por um C no códon destacado (cTg > cCg), gerando uma mutação de ponto. Esse códon contém parte da sequência PAM (TGG). Caso a edição ocorra eficientemente, a nova sequência continuará contendo uma sequência PAM (CGG) e a sequência do gRNA não será alterada. Nessa situação, o complexo gRNA-Cas9 continuará se ligando neste mesmo local e continuará clivando a mesma fita, mesmo que ela já tenha sido editada, até que eventualmente *indels* serão inseridas no local, impedindo o complexo de agir novamente. Assim, o produto final será composto majoritariamente por sequências com *indels* e praticamente nenhuma sequência com a edição de interesse. Para contornar este problema, podemos inserir algumas alterações silenciosas na sequência molde, de modo que o complexo gRNA-Cas9 não consiga mais reconhecer a sequência já editada e acabe perdendo sua atividade no local. No exemplo, duas bases foram substituídas (C > T) no genoma, em dois códons diferentes, sem alterar a sequência de aminoácidos da proteína.

## DNA:

Genoma CCAGAGAGTGGGGCTGGTTGCCAGTCAGAAGAACGACCTGGACGCAGTGGCACTGATGCATCCCGATGGCTCTG  
 molde CCAGAGAGTGGGGCTGGTTGCCAGTCAGAAGAATGATCCGACGCAGTGGCACTGATGCATCCCGATGGCTCTG

## Proteína:



**Figura 6:** Desenho de sequência molde para reparo direcionado por homologia (HDR).

Nota: O códon para ser editado (destacado em azul) contém parte da sequência PAM (em vermelho). Com a edição correta do nucleotídeo de interesse (T>C), a sequência PAM permanece ativa (tGG>cGG) e o sistema continuaria clivando a mesma fita de DNA, mesmo após o evento de reparo e recombinação. Adicionando alterações silenciosas (destacadas em laranja) na porção *seed* do gRNA (gRNA sublinhado, porção *seed* em verde), garantimos que o sistema não clive o DNA já editado, uma vez que ele não reconhecerá mais essa sequência. A proteína produzida, por sua vez, terá alteração de aminoácidos somente no códon de interesse (em azul, Leu > Pro) e não nas alterações silenciosas (Asn > Asn e Asp > Asp).

Fonte: Criado com BioRender.com.



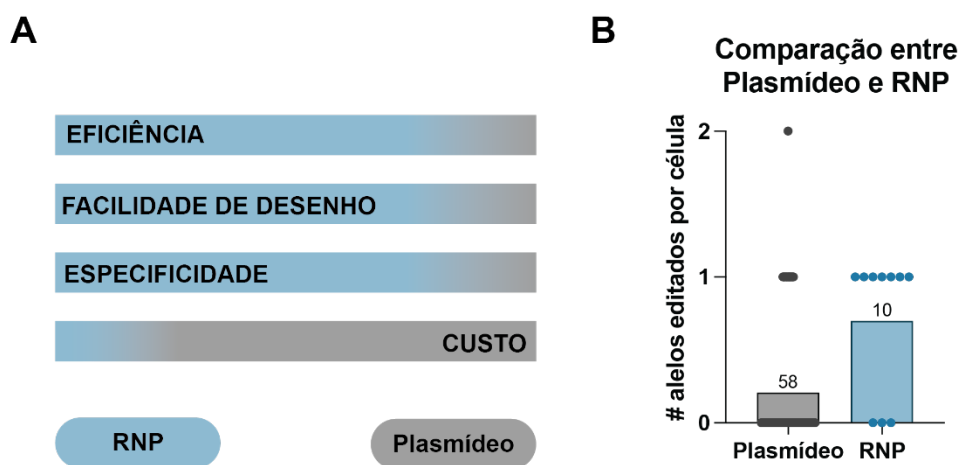
Antes de desenhar a sequência doadora (e o gRNA, inclusive), é recomendado sequenciar o alvo na célula de interesse. A presença de polimorfismos pode afetar significativamente a eficiência de clivagem ou de recombinação, pois a presença de um único nucleotídeo alterado pode inibir por completo o reparo por recombinação<sup>14</sup>.

### Entregando os componentes do complexo CRISPR/Cas9

A maneira mais economicamente acessível de entrega dos componentes do sistema CRISPR/Cas9 às células é por meio de plasmídeos que, em um único vetor, expressam o gRNA e a Cas9. Existem diversos plasmídeos disponíveis que, além do CRISPR, também expressam proteínas fluorescentes ou genes de resistência a antibióticos, facilitando a seleção das células transfectadas e potencialmente editadas. Estes plasmídeos são uma boa opção de

baixo custo para edição de linhagens celulares de fácil manipulação. As desvantagens do uso desse sistema são a baixa eficiência de transfecção e de edição de células primárias<sup>15</sup> e o aumento da atividade de clivagem fora do alvo (os *off-targets*), uma vez que o plasmídeo permanece ativo por dias dentro das células<sup>16</sup>. Além disso, é necessário ter conhecimento básico em clonagem para poder inserir as sequências de gRNA desejadas (Figura 7A).

A alternativa aos plasmídeos mais utilizada é a entrega dos componentes já nas suas formas ativas, pré-complexando a molécula de gRNA à proteína Cas9 *in vitro*, formando um complexo ribonucleoproteico (RNP) que pode ser transfectado às células. Por não precisar ser transcrito ou traduzido, o complexo RNP tem ação imediata após ser internalizado, resultando em edição mais rápida e muito mais eficiente (Figura 7B). Outra vantagem é o menor tempo de permanência nas células, minimizando a ação fora do alvo<sup>16</sup>.



**Figura 7:** Comparação entre plasmídeo e complexo ribonucleoproteico (RNP) para edição por CRISPR/Cas9.

A: O uso de plasmídeos, embora tenha menor custo, é menos eficiente, tem mais atividade inespecífica e demanda maior conhecimento de clonagem para produção do vetor. Nesse contexto, uso de RNP é mais simples e mais eficiente; B: Comparação entre as duas formas de entrega. Ambas as condições (plasmídeo ou RNP) foram avaliadas utilizando a mesma sequência de gRNA (IDUA1, apresentado na Figura 2) com alvo no gene *IDUA*. Na condição Plasmídeo, apenas 12 alelos foram editados dos 116 sequenciados, resultando numa eficiência de edição de apenas 10%. Na condição RNP, *indels* foram encontradas em 7 dos 20 alelos analisados, o que indica eficiência de 35%. No gráfico, cada ponto representa um clone e o número acima das barras representa o número de clones analisados para cada condição.

Uma terceira opção de entrega é a utilização da Cas9 na forma de mRNA, atuando como um intermediário entre a entrega da proteína pronta e da entrega como DNA no plasmídeo. Como mRNA, a Cas9 é produzida mais rapidamente do que como plasmídeo, pois pula a etapa de transcrição de DNA em RNA e passa diretamente à tradução para proteína. Estima-se que a tradução da Cas9 nas células eucarióticas leve apenas 5 minutos<sup>17</sup>. Além de iniciar a edição rapidamente, o mRNA não permanece nas células por muito tempo, diminuindo a chance de *off-targets*<sup>16</sup>.

Embora o uso de mRNA seja mais eficiente que a utilização de plasmídeos, algumas considerações devem ser observadas ao se utilizar Cas9 mRNA, principalmente em células primárias. Por exemplo, foi demonstrado que inserir mRNA de Cas9 em células-tronco hematopoiéticas pode causar uma maior repressão transcricional global em comparação com a Cas9 proteína<sup>18</sup>. Também é interessante observar que, embora a molécula do mRNA contenha menos nucleotídeos que a do plasmídeo, o tamanho da molécula de mRNA é maior, uma vez que o mRNA

é linearizado enquanto o plasmídeo é altamente compactado, o que pode interferir na transfecção<sup>17</sup>.

### **Off-targets – a edição fora do alvo**

A atividade fora do alvo (ou *off-target*, em inglês) é a atividade inespecífica do sistema. Sempre que possível, é recomendado desenhar o experimento de modo que se tenha o mínimo possível de atividade inespecífica. Guias com alta atividade fora do alvo tendem a ter atividade no alvo reduzida<sup>19</sup>. Além disso, caso ocorram mutações em outros sítios, existe a possibilidade de o fenótipo observado na célula ser um efeito das alterações inespecíficas e não efeito da edição no gene alvo.

A maioria dos programas de desenho de gRNA já fornece os possíveis sítios inespecíficos e a probabilidade de atividade do sistema nesses pontos. Algumas ferramentas específicas, como o COSMID (<https://crispr.bme.gatech.edu>) e o Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder>) fornecem uma lista extensa de possíveis sítios inespecíficos para cada gRNA. Frequentemente, não é possível desenhar gRNAs no local de interesse sem que haja sítios inespecíficos possíveis; nesses casos, é preferível escolher gRNAs que tenham esses *off-targets* em regiões intergênicas ou intrônicas, evitando as regiões codificantes. A análise extensa de *off-targets* se torna mandatória em casos de utilização do CRISPR/Cas9 para terapia, e diversas técnicas já foram descritas<sup>20</sup>.

Uma alternativa para evitar a ação inespecífica do CRISPR/Cas9 é utilizar enzimas Cas9 de alta fidelidade (*high fidelity* Cas9, ou Hifi Cas9)<sup>21</sup>. Elas apresentam modificações em sua estrutura, que as tornam menos propensas a atuar na presença de bases desemparelhadas.

## **PARTE 2: SOBRE AS CÉLULAS**

### **Escolhendo a linhagem celular**

A escolha do tipo celular é um ponto muito importante na geração de um modelo celular e depende do objetivo e da disponibilidade dos recursos. Células primárias possuem tempo de cultivo limitado e, por isso, impõem uma restrição importante no modelo, o que deve ser considerado cuidadosamente antes de iniciar o projeto. A utilização de células imortalizadas é mais fácil, uma vez que essas linhagens crescem facilmente e podem ser cultivadas indefinidamente<sup>22</sup>.

Ao planejar o projeto, deve-se considerar se o tipo celular é importante para o estudo e se a análise a ser feita no modelo depende ou não do tipo celular. Muitas perguntas de pesquisa podem ser respondidas com modelos celulares genéricos, sem a necessidade de se utilizar um tipo celular específico.

Exemplos de projetos que independem do tipo celular:

- Avaliar a morte celular causada por um novo fármaco em células que não expressem o gene A.
- Utilizar células nocaute para o gene B como controle negativo em um ensaio.
- Avaliar se a ausência de expressão do gene C aumenta a proliferação celular.

Entretanto, muitas vezes, busca-se utilizar modelos mais relevantes para o objeto de pesquisa, gerando modelos com tipos celulares mais informativos.

Exemplos:

- Avaliar o acúmulo de metabólitos em células nocautes para o gene A, o qual está relacionado a uma doença neurodegenerativa – pode ser mais interessante utilizar células neurais.
- Avaliar a contratilidade de células musculares após o tratamento com um novo fármaco, como potencial terapia para uma miopatia – outros tipos celulares não terão função contrátil.
- Avaliar o efeito do gene B (que só é expresso em fibroblastos) na regulação da proteína C – como só há expressão de B em fibroblastos, nocautear esse gene em outros tipos celulares não surtirá efeito na proteína C.

Além da relevância biológica do tipo celular, também pode-se considerar a facilidade de manipulação das células a cada etapa de edição, como o número de cromossomos (algumas linhagens são aneuploides, com múltiplos cromossomos, aumentando o número de alelos a serem modificados), a transfecção (alguns tipos celulares não toleram bem o processo de transfecção) e o isolamento de clones (algumas linhagens não expandem bem quando estão em baixa densidade celular).

### **Métodos de transfecção e a variação entre os tipos celulares**

Transfecção é o nome dado ao processo de introduzir ácidos nucleicos em células eucarióticas utilizando métodos não-virais (para métodos virais, utiliza-se o termo transdução). Os métodos de transfecção são divididos em físicos e químicos, sendo os mais frequentemente utilizados a eletroporação (físico) e a utilização de moléculas catiônicas, que incluem lipossomos e polímeros (químico)<sup>22</sup>.

A eletroporação consiste em aplicar um campo elétrico numa solução de células, gerando poros na membrana plasmática que permitem a entrada de moléculas. A transfecção química, por outro lado, utiliza-se das diferenças de carga elétrica entre as moléculas carreadoras e a membrana plasmática – os lipídeos ou polímeros são carregados positivamente

e interagem com a membrana negativa, o que induz a endocitose e a internalização de moléculas exógenas<sup>23</sup>. Ambas as estratégias são eficientes, mas possuem custos distintos: a eletroporação é praticamente sem custo, uma vez que se tenha o equipamento. Já a transfecção química utiliza reagentes geralmente custosos, mas não há a necessidade de ter equipamento especializado. Portanto, a escolha do método depende da disponibilidade de recursos e da frequência com que as transfecções serão feitas no laboratório.

A Tabela 3 ilustra alguns exemplos de linhagens celulares de fácil transfecção que podem ser

utilizadas e a eficiência de transfecção esperada com diferentes métodos, de acordo com seus fabricantes. Observe como a eficiência varia consideravelmente entre os métodos; por exemplo, a transfecção das células RAW264 pode variar de <30% a >80%, dependendo do método e das condições utilizadas. Ou seja, para cada novo experimento, as etapas devem ser otimizadas e determinadas empiricamente. Outros fatores, como o tamanho do plasmídeo, também podem influenciar a eficiência (plasmídeos maiores tendem a transfectar menos eficientemente).

**Tabela 3:** Comparação de eficiência de transfecção entre diferentes métodos de acordo com o fabricante.

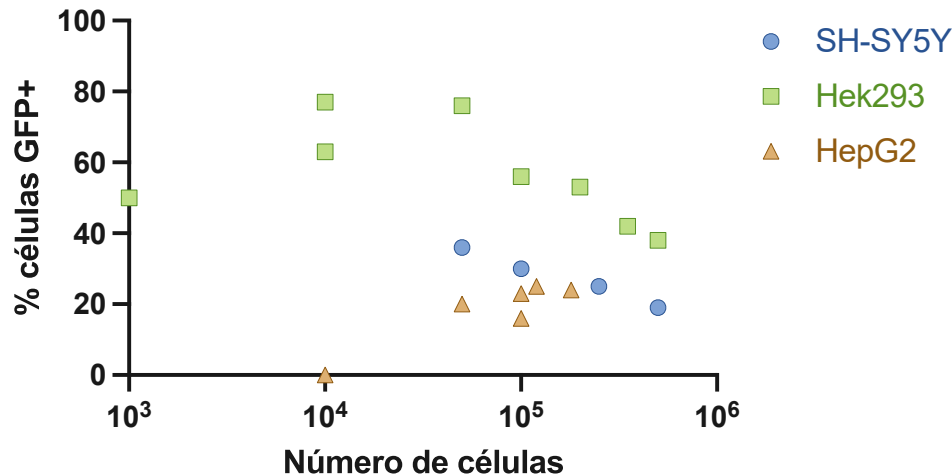
Linhagem celular	Eletroporação		Moléculas catiônicas	
	Nucleofector (Lonza)	Lipofectamine 3000 (ThermoFisher)	FuGENE ou ViaFect (Promega)	jetPRIME (Polyplus)
3T3	51-79%	51-79%	51-79%	51-79%
A549	>80%	51-79%	>80%	NA
C2C12	51-79%	51-79%	>80%	70-90%
Caco-2	>80%	51-79%	NA	<30%
CHO-K1	51-79%	51-79%	NA	51-79%
COS-7	>80%	51-79%	>80%	51-79%
H9c2	>80%	51-79%	>80%	NA
HCT116	>80%	>80%	>80%	51-79%
HEK 293	>80%	>80%	>80%	>80%
HeLa	>80%	>80%	>80%	>80%
HepG2	51-79%	>80%	>80%	51-79%
Hs 578T	51-79%	>80%	NA	NA
Huh-7	51-79%	51-79%	>80%	30-50%
Jurkat	51-79%	<30%	>80%	NA
K-562	>80%	30-50%	NA	NA
L929	>80%	<30%	NA	NA
LNCaP	51-79%	>80%	>80%	NA
MCF7	51-79%	30-50%	>80%	30-50%
Neuro-2a	51-79%	>80%	NA	NA
PANC-1	>80%	51-79%	NA	NA
PC12	>80%	51-79%	>80%	NA
RAW264.7	51-79%	<30%	>80%	30-50%
SH-SY5Y	>80%	<30%	NA	70-80%
SW480	51-79%	51-79%	NA	NA
U2OS	>80%	>80%	>80%	NA
Vero	>80%	30-50%	NA	30-50%

NA: dado indisponível.

Um dos fatores que influenciam diretamente a eficiência da transfecção é o número de células utilizado. A recomendação geral é utilizar células com aproximadamente 70% de confluência; esta medida, porém, pode ser subjetiva e variar entre pesquisadores. A Figura 8 mostra a eficiência de transfecção obtida em nosso laboratório utilizando Lipofectamine® 3000 em

diferentes linhagens celulares e com diferente número de células. As células foram transfectadas com um plasmídeo que expressa proteína verde fluorescente (GFP) e a porcentagem de células GFP+ foi avaliada por citometria de fluxo. Para células Hek293, como no exemplo, a eficiência de transfecção aumentou de 40% a 80% com a diminuição do número de células.

### Otimização da transfecção



**Figura 8:** Exemplo do efeito do número de células na eficiência de transfecção de diferentes linhagens celulares usando Lipofectamine 3000.

Nota: As linhagens celulares SH-SY5Y, Hek293 e HepG2 foram plaqueadas em diferentes quantidades e transfectadas em placas de 12 poços, utilizando 1 µg do plasmídeo pIRES-eGFP-Puro, numa proporção de 1,5:1 com Lipofectamine® 3000. Para as linhagens SH-SY5Y e Hek293, é possível observar que a porcentagem de células GFP+ diminui conforme o número de células utilizadas na transfecção foi maior. O número de células não parece interferir dramaticamente na eficiência de transfecção da linhagem HepG2, embora poucas células resultaram em transfecção nula nestas condições. Cada ponto no gráfico representa um experimento distinto.

Os testes de otimização podem ser feitos utilizando poucas células e em placas de cultivo com pouca área. Uma vez estabelecido o melhor protocolo, a transfecção pode ser escalonada para quantidades maiores para realizar o experimento. A Tabela 4

traz o fator de multiplicação para cada frasco de cultivo e, como exemplo de reagente de transfecção, as quantidades de Lipofectamine® 3000. Entretanto, o mesmo fator de multiplicação pode ser utilizado para escalonar experimentos com outros reagentes.

**Tabela 4:** Escalonando reagentes para transfecção.

Frasco de cultivo	Fator de multiplicação*	Área (cm <sup>2</sup> )	Volume meio (ml)	Lipofectamine (µl)	DNA (µg)	P3000 (µl)	Opti-MEM (µl)
96 poços	0.16	0.32	0.1	0.12	0.1	0.2	2 x 4.25
48 poços	0.55	1.1	0.3	0.4	0.3	0.6	2 x 12.5
24 poços	1	2	0.5	0.75	0.5	1	2 x 25
12 poços	2	4	1	1.5	1	2	2 x 50
6 poços	4.75	9.5	1.5	3.6	2.4	5	2 x 125
T25	12.5	25	2	9.4	6.25	12.5	2 x 312
T75	37.5	75	10	28.1	18.75	37.5	2 x 986

\* O fator de multiplicação apresentado nesta tabela é referente à área do frasco de cultivo e pode ser utilizado para escalonar qualquer experimento envolvendo células em cultivo.

### **Métodos de isolamento de clones**

O isolamento e expansão de clones tem a finalidade de gerar uma população homogênea, geneticamente idêntica. No contexto de um experimento de edição genômica, isso significa que todas as células terão a mesma edição – seja um nocaute ou um *knock-in*.

A maneira mais comum de se fazer isolamento clonal é utilizando citometria de fluxo e sorteamento de célula única (ou *single-cell sorting*, em inglês). Para isso, preparam-se placas de 96 poços com meio de cultivo para receber uma única célula por poço. Após o sorteamento, as células ficam em cultivo por algumas semanas até atingirem confluência suficiente para serem expandidas para placas com área maior. A vantagem desse método é a garantia de obtenção de populações clonais e a baixa manutenção, pois requer somente poucas trocas de meio ao longo de 30 dias. Outro ponto bastante positivo é que, caso utilize-se métodos contendo marcadores de seleção (como GFP, por exemplo), pode-se selecionar somente as células transfectadas para fazer o plaqueamento, o que aumenta a eficiência do processo como um todo. As desvantagens incluem a necessidade de ter o equipamento disponível e a dificuldade de alguns tipos celulares crescerem a partir de células únicas<sup>22,24</sup>.

Outra maneira de se isolar clones é por diluição seriada. Para isso, faz-se uma suspensão bem diluída de células e plaqueia-se em placas de 96 poços o equivalente a 0,5 células, ou menos, por poço. Assim, a chance de se obter poços com mais de uma célula diminui consideravelmente. A vantagem desse método é a facilidade de execução, por não requerer equipamento especializado. Entretanto, a principal desvantagem é a possibilidade de, inadvertidamente, plaquear 2 células em um mesmo poço e obter populações mistas<sup>22,24</sup>.

Por fim, pode-se plaquear células aderentes em grandes áreas e em baixa densidade. Assim, as células ficarão espalhadas pela área de cultivo e crescerão em algumas colônias isoladas. Quando as colônias apresentarem múltiplas células, transfere-se a colônia para ser expandida em um poço isolado. Esse método funciona melhor para células que não crescem bem quando plaqueadas sozinhas em um único poço, provavelmente por necessitarem de sinalização das células vizinhas; porém, a chance de contaminação de uma colônia clonal com outras células é maior que nos demais métodos<sup>22</sup>.

### **Expansão clonal é necessária?**

Nem todos os modelos requerem isolamento de clones e é importante avaliar a sua necessidade antes de iniciar o projeto, uma vez que esta etapa é bastante dispendiosa. Considere o exemplo hipotético: uma doença é causada por deficiência ou ausência

completa da enzima B, responsável pela conversão do substrato A no produto C. Com a deficiência de B, há acúmulo de A, que é tóxico. Queremos avaliar a eficácia de duas possíveis terapias:

- Uma molécula que degrada A independente da enzima B;
- Uma molécula que se liga nos aminoácidos alterados da enzima B, modula sua estrutura e aumenta sua atividade.

No primeiro caso, o efeito do tratamento independe da enzima B; ela pode estar com a estrutura alterada ou pode estar completamente ausente e ainda será possível medir o efeito do tratamento, ou seja, a diminuição do componente tóxico A. Neste caso, pode-se gerar uma população mista nocaute para o gene B, contendo células com mutações diversas, desde que a proteína não seja produzida ou não tenha atividade. Já no segundo caso, a enzima B deve estar presente e deve possuir as alterações específicas em sua estrutura para que o efeito da molécula moduladora seja avaliado. Portanto, para este segundo experimento, é importante que todas as células tenham a mesma alteração específica e, assim, o isolamento de clones e a expansão clonal se fazem necessários.

### **Vantagem ou desvantagem seletiva**

Dependendo da alteração a ser induzida nas células, podemos induzir vantagem ou desvantagem seletivas nas células editadas. Caso a edição ocorra em genes relacionados à proliferação celular, por exemplo, as células editadas poderão expandir mais rapidamente do que as não editadas e, assim, dominar o cultivo em algumas passagens e se tornar uma população praticamente homogênea. Por outro lado, caso a edição confira um efeito negativo para a sobrevivência ou proliferação celular, as células editadas diminuirão com o tempo e serão perdidas. Para avaliar se as células possuem vantagem ou desvantagem seletiva, pode-se analisar a proporção de alelos editados ao longo do tempo: 24h, 48h, 72h, 7 e 14 dias, por exemplo. Conforme a cinética esperada de edição (principalmente se utilizado RNP), a proporção de alelos editados pode aumentar em até 72h pós-edição, mantendo-se estável após esse tempo<sup>16</sup>.

### **Validação do modelo**

Uma vez obtidas as células editadas, devidamente sequenciadas e com o genótipo confirmado, deve-se validar o modelo. Diversas estratégias podem ser utilizadas, como *western blot* (para demonstrar a ausência ou superexpressão da proteína), expressão gênica (similar ao *western blot*, porém quantificando mRNA), imunofluorescência ou citometria de fluxo (utilizando anticorpos contra a proteína de interesse),



atividade enzimática (caso seja uma enzima a proteína de interesse), ensaios colorimétricos, dentre outros<sup>22</sup>.

**PARTE III: INICIANDO O PROJETO**

**Planejamento e desenho experimental**

O primeiro passo é a definição do objetivo do projeto e quais perguntas o modelo celular desenvolvido poderá responder. A partir disso, deve-se pensar na estratégia que será usada para

edição (qual o gene, se será *knock-in* ou *knock-out*, se será mutação específica ou se pode apresentar *indels* variadas) e qual o tipo celular será utilizado. É recomendado utilizar células e genes/proteínas conhecidas pelos pesquisadores para o primeiro projeto do laboratório, o que facilitará no cultivo destas células e nos ensaios funcionais para validar o modelo.

O fluxograma a seguir (Figura 9) resume todas as etapas da criação do modelo e pode servir como norteador para quem estiver iniciando na área.

**Quero fazer um modelo com CRISPR/Cas9: como começo?**

O primeiro passo é decidir qual alteração se deseja provocar e qual é o objetivo do projeto.

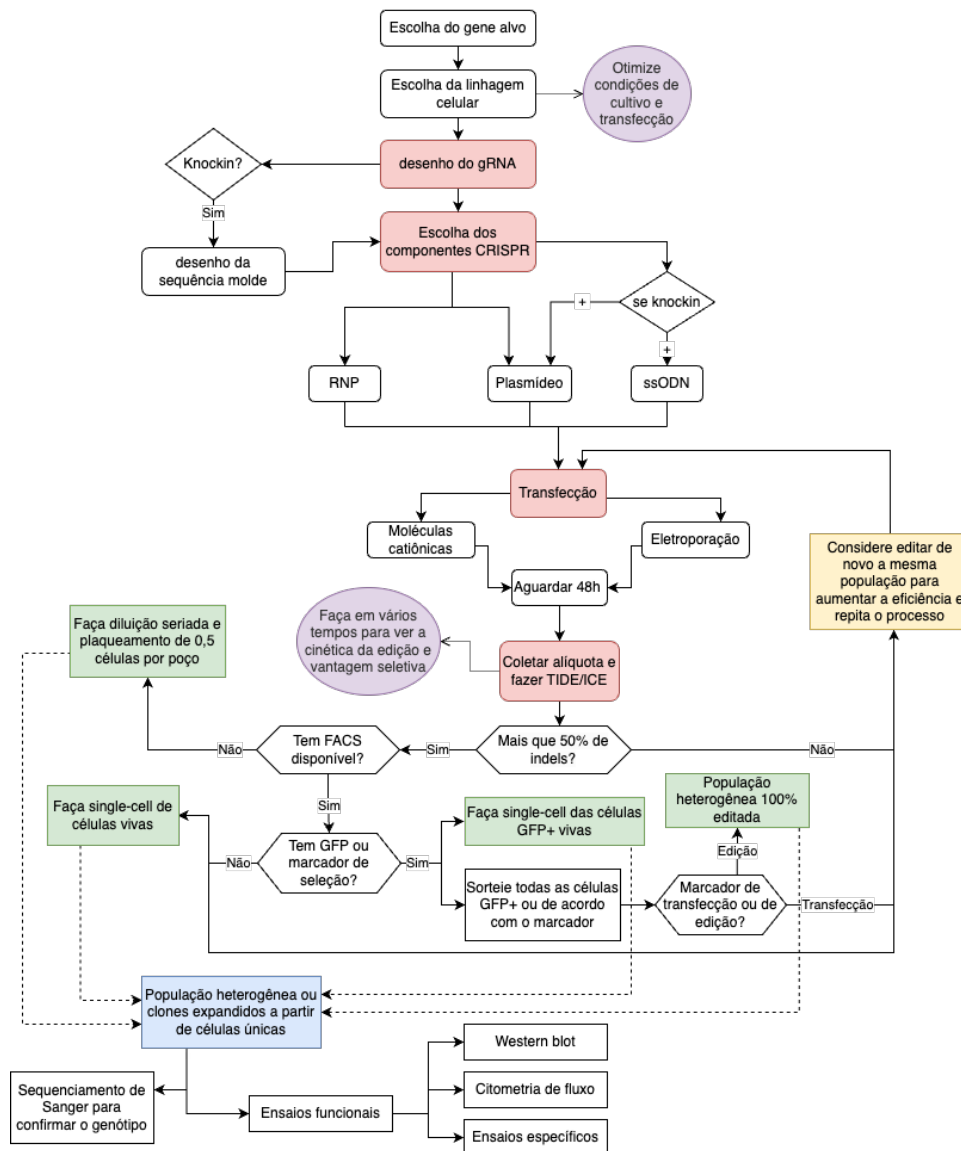


Figura 9: Fluxograma para geração de modelo celular usando CRISPR/Cas9.

### A otimização de cada etapa é fundamental

É importante considerarmos a eficiência de cada etapa da criação do modelo. Etapas ineficientes, quando somadas, podem tornar o projeto inviável pelo custo e pelo tempo de execução. Portanto, o planejamento e a otimização de todos os protocolos são necessários para obter a maior eficiência possível.

A Figura 10 ilustra dois experimentos conduzidos com condições otimizadas e condições não-otimizadas. No primeiro experimento, utilizando protocolos padrão e sem otimização, a cada 3.000

células, obtivemos apenas um clone com edição bialélica, o que representou o sequenciamento de 50 clones até um apresentar alterações em ambos os alelos. O mesmo experimento foi repetido utilizando condições otimizadas para o nosso laboratório (gRNA com maior atividade escolhido, entregue à célula como RNP e utilizando protocolo de transfecção otimizado) e um clone com edição bialélica foi obtido a cada 26 células iniciais, sendo que apenas 3 clones precisaram ser sequenciados para identificação do clone de interesse.

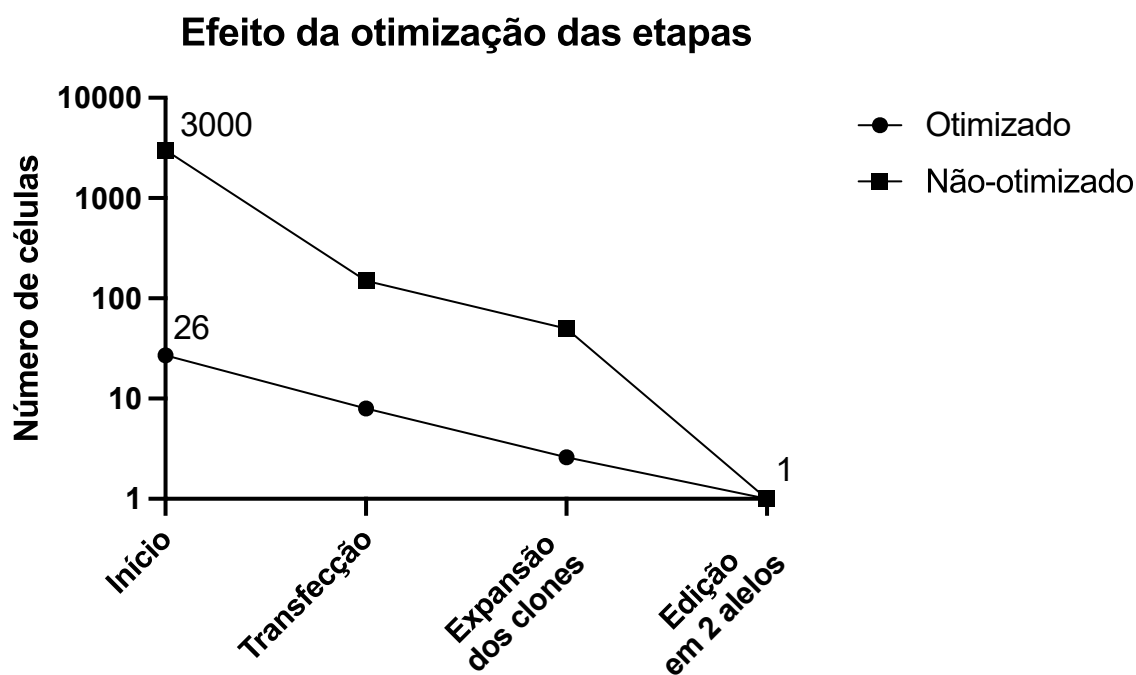


Figura 10: Efeito de cada etapa na eficiência do processo de geração de uma célula nocaute.

Nota: A eficiência de transfecção, de expansão dos clones e de edição bialélica foi de, respectivamente, 5%, 30% e 0,5% para o experimento não-otimizado, e de 30%, 30% e 50% para o otimizado. A otimização pode aumentar a eficiência do processo em até mais de 100 vezes, como no caso exemplificado.

## CONCLUSÃO

Baseado na nossa experiência criando diversos modelos nos últimos anos, apresentamos no [material suplementar](#) protocolos detalhados de como desenvolver modelos celulares utilizando CRISPR/Cas9. Embora este seja um projeto de meses (estimamos, no mínimo, 12 meses desde a concepção do projeto até a obtenção de células clonais), acreditamos que muitos laboratórios no Brasil têm estrutura e recursos humanos capacitados para desenvolver estes protocolos. Nosso objetivo com esse manuscrito é compartilhar o conhecimento e a nossa experiência no assunto

com outros pesquisadores para impulsionar a pesquisa biotecnológica no Brasil.

### Leituras recomendadas

Revisão aprofundada sobre CRISPR/Cas9<sup>1</sup>;  
Capítulo de livro detalhando processos de geração de modelos nocaute com exemplos de modelos já desenvolvidos<sup>22</sup>;

Protocolo pioneiro em edição de células eucarióticas, que contém maiores detalhes sobre a etapa de clonagem<sup>25</sup>.

### Agradecimentos

Os pesquisadores agradecem ao CNPq, FAPERGS, FAPESP e CAPES por auxílios que permitiram a realização deste projeto.

## Referências

- Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys.* 2017;46:505-29.
- Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol.* 2020;38(7):824-44.
- Mir A, Edraki A, Lee J, Sontheimer EJ. Type II-C CRISPR-Cas9 biology, mechanism, and application. *ACS Chem Biol.* 2018;13(2):357-65.
- Sternberg SH, Doudna JA. Expanding the biologist's toolkit with CRISPR-Cas9. *Mol Cell.* 2015;58(4):568-74.
- Paquet D, Kwart D, Chen A, Sproul A, Jacob S, Teo S, et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature.* 2016;533(7601):125-9.
- Kwart D, Paquet D, Teo S, Tessier-Lavigne M. Precise and efficient scarless genome editing in stem cells using CORRECT. *Nat Protoc.* 2017;12(2):329-54.
- McCarty NS, Graham AE, Studená L, Ledesma-Amaro R. Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation. *Nat Commun.* 2020;11(1):1281.
- Konstantakos V, Nentidis A, Krithara A, Paliouras G. CRISPR-Cas9 gRNA efficiency prediction: an overview of predictive tools and the role of deep learning. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(7):3616-37.
- Usher I, Ligammari L, Ahrabi S, Hepburn E, Connolly C, Bond GL, et al. Optimizing CRISPR/Cas9 editing of repetitive single nucleotide variants. *Front Genome Ed.* 2022;4:932434.
- Poletto E, Baldo G, Gomez-Ospina N. Genome editing for mucopolysaccharidoses. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2):500.
- Schubert MS, Thommandru B, Woodley J, Turk R, Yan S, Kurgan G, et al. Optimized design parameters for CRISPR Cas9 and Cas12a homology-directed repair. *Sci Rep.* 2021;11(1):19482.
- Li K, Wang G, Andersen T, Zhou P, Pu WT. Optimization of genome engineering approaches with the CRISPR/Cas9 system. *PLoS One.* 2014;9(8):e105779.
- Okamoto S, Amaishi Y, Maki I, Enoki T, Mineno J. Highly efficient genome editing for single-base substitutions using optimized ssODNs with Cas9-RNPs. *Sci Rep.* 2019;9(1):4811.
- Tham KC, Kanaar R, Lebbink JHG. Mismatch repair and homeologous recombination. *DNA Repair (Amst).* 2016;38:75-83.
- Hendel A, Bak RO, Clark JT, Kennedy AB, Ryan DE, Roy S, et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat Biotechnol.* 2015;33(9):985-9.
- Liang X, Potter J, Kumar S, Zou Y, Quintanilla R, Sridharan M, et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol.* 2015;208:44-53.
- Xu CF, Chen GJ, Luo YL, Zhang Y, Zhao G, Lu ZD, et al. Rational designs of *in vivo* CRISPR-Cas delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021;168:3-29.
- Cromer MK, Vaidyanathan S, Ryan DE, Curry B, Lucas AB, Camarena J, et al. Global transcriptional response to CRISPR/Cas9-AAV6-based genome editing in CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem and progenitor cells. *Mol Ther.* 2018;26(10):2431-42.
- Moreb EA, Hutmacher M, Lynch MD. CRISPR-Cas "non-target" sites inhibit on-target cutting rates. *CRISPR J.* 2020;3(6):550-61.
- Zhang XH, Tee LY, Wang XG, Huang QS, Yang SH. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2015;4:e264.
- Slymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science.* 2016;351(6268):84-8.
- Poletto E, Baldo G. Creating cell lines for mimicking diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2021;181:59-87.
- Yip BH. Recent advances in CRISPR/Cas9 delivery strategies. *Biomolecules.* 2020;10(6):839.
- Giuliano CJ, Lin A, Girish V, Sheltzer JM. Generating single cell-derived knockout clones in mammalian cells with CRISPR/Cas9. *Curr Protoc Mol Biol.* 2019;128(1):e100.
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281-308.

Recebido: 12 jul 2023

Aceito: 17 out 2023