

Artigo de revisão

Cristiane Batista Bezerra Torres¹
Wagner Soares Pessoa¹

Células-tronco pluripotentes induzidas e edição de genes: avanços tecnológicos da pesquisa em medicina regenerativa e terapia gênica

Induced pluripotent stem cells and gene editing: technological advances in regenerative medicine and gene therapy research

ABSTRACT

Gene reprogramming of differentiated cells allowed the generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs), which do not present the ethical concerns that involve embryonic stem cells or the risk of immunological rejection. The technology of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats with Nuclease Associated 9 (CRISPR-Cas9), allows the correction of genetic defects. The present study aims to review the main methodological issues related to iPSCs and CRISPR-Cas9. An electronic search was performed on the databases LILACS, MEDLINE, PubMed and SciELO, through the expressions "induced pluripotent stem cells" and "CRISPR Cas9". iPSCs can be cultured and differentiated in any cell of the body, consisting of a useful model for the gene edition with CRISPR-Cas9, opening new perspectives in research in regenerative medicine and gene therapy.

¹.Departamento de Morfologia,
Universidade Federal do Piauí

KEYWORDS

Induced Pluripotent Stem Cells; Proteins Associated with CRISPR; Editing of Genes.

PALAVRAS - CHAVE

Células-Tronco Pluripotentes Induzidas; Proteínas Associadas a CRISPR; Edição de Genes.

AUTOR CORRESPONDENTE:

Cristiane Batista Bezerra Torres
<cristianebbtorres@ufpi.edu.br>

Departamento de Morfologia, Campus Ministro Petrônio Portela, UFPI CEP 64049-550 Teresina - PI- Brasil

Submetido em: 18/09/2017

Aceito em: 21/02/2018

RESUMO

A reprogramação gênica de células diferenciadas permitiu a obtenção de células-tronco pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cells* – iPSCs) que não apresentam os questionamentos éticos que envolvem as células-tronco embrionárias e nem o risco de rejeição imunológica. A tecnologia do Conjunto de Repetições Palindrômicas Regularmente Espaçadas com Nuclease Associada 9 (CRISPR-Cas9), permite a correção de defeitos genéticos. O presente estudo tem por objetivo revisar as principais questões metodológicas relacionadas às iPSCs e o CRISPR-Cas 9. Realizou-se uma busca eletrônica nas bases de dados LILACS, MEDLINE, PubMed e SciELO, por meio das expressões “induced pluripotent stem cells” e “CRISPR Cas9”. As iPSCs podem ser expandidas em cultura e diferenciadas em qualquer célula do corpo, consistindo em um modelo útil para a edição de genes com o CRISPR-Cas9, abrindo novas perspectivas na pesquisa em medicina regenerativa e terapia gênica.

INTRODUÇÃO

Em 2006, Takahashi e Yamanaka obtiveram as primeiras células-tronco pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cells* – iPSCs) a partir de fibroblastos transformados por meio da expressão de fatores de transcrição específicos (*Klf4*, *Sox2*, *Oct4* e *Myc*). Tais fatores de transcrição, característicos de células pluripotentes, foram introduzidos por meio de retrovírus com integração ao genoma e expressos simultaneamente. As iPSCs resultantes apresentaram características de células-tronco embrionárias (*embryonic stem cells* - ESCs) em vários testes. Tais resultados impactaram a comunidade científica: o debate ético sobre o uso de células pluripotentes tornou-se obsoleto, pois foi estabelecido um método de produção de tais células sem o uso de embriões humanos e livres dos problemas de rejeição imunológica, uma vez que são células autólogas (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2013).

Houve um súbito interesse de vários grupos de pesquisadores em realizar experimentos funcionais com as iPSCs e, desde então, inúmeros trabalhos têm sido publicados. Takahashi e outros (2007) comprovaram que os fatores de transcrição *Klf4*, *Sox2*, *Oct4* e *Myc* são efetivos em reprogramação de células humanas somáticas. Outro grupo demonstrou que *Nanog*, *Sox2*, *Oct4* e *Lin28* também são capazes de reprogramar células somáticas humanas (YU et al., 2007). O entusiasmo com as iPSCs está no seu potencial de uso em medicina regenerativa, especialmente na substituição de células doentes. Isto é possível graças às técnicas de transferência celular, como injeção intravenosa e administração local (HIRSCHI; LI; ROY, 2014). As iPSCs também originam linhagens celulares específicas, possibilitando uma fonte praticamente inesgotável de células para o estudo dos mecanismos de ação das doenças em um modelo paciente-específico (HOCKEMEYER; JAENISCH, 2016).

Com os avanços na tecnologia de edição de genes, percebeu-se que era possível aliar a produção de iPSCs de pacientes com doenças genéticas à correção do gene defeituoso. Em 2013, foi apresentado pela primeira vez o Conjunto de Repetições Palindrômicas Regularmente Espaçadas (CRISPR), um sistema onde uma nuclease associada (Cas9), guiada por uma molécula de RNA, especialmente sintetizada, cortava a dupla fita de DNA humano em pontos específicos, ativando as vias de reparo endógenas (CONG et al., 2013; MALI et al., 2013). Em 2015, o CRISPR-Cas9 foi aplicado na edição de genes de embriões humanos (LIANG et al., 2015), causando muita controvérsia na comunidade científica (WADDINGTON et al., 2016; GUIMARÃES, 2016).

Considerando a relevância e a atualidade do tema, especialmente na área de biologia celular, o presente trabalho objetivou revisar as principais questões metodológicas relativas às tecnologias das iPSCs e do CRISPR-Cas9. Uma busca eletrônica foi realizada nas bases

de dados LILACS, MEDLINE, PubMed e SciELO, por meio das expressões de busca “induced pluripotent stem cells” e “CRISPR Cas9”. Para a seleção de artigos úteis à discussão, utilizou-se como critérios de inclusão a conexão direta ao tema e a disponibilidade do estudo na íntegra.

DESENVOLVIMENTO

O avanço científico representado pelas iPSCs resulta do acúmulo de conhecimento ao longo de cinco décadas de pesquisas. Em 1962, John Gurdon demonstrou que a diferenciação celular não era um caminho de via única: ao transferir o núcleo de uma célula diferenciada de sapo para um oócito anucleado, obteve um sapo completamente desenvolvido. Esse experimento também provou que as células somáticas não só retêm toda a informação genética, como rejuvenescem por manipulação artificial (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2013). Décadas mais tarde, a clonagem da ovelha Dolly com a mesma técnica mostrou que os achados de Gurdon se estendiam aos mamíferos (CAMPBELL et al., 1996).

As primeiras iPSCs foram obtidas de fibroblastos dérmicos (TAKAHASHI; YAMANAKI, 2006; TAKAHASHI et al., 2007; YU et al., 2007). O sangue do cordão umbilical (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2013) e o sangue periférico também são fontes promissoras (OKITA et al., 2013). Ressalte-se que variações entre diferentes linhagens de iPSCs podem resultar do tipo de célula da qual foram originadas e do protocolo experimental usado na sua reprogramação (HIRSCHI; LI; ROY, 2014). Apesar da vantagem da diversidade de fontes, as iPSCs possuem algumas desvantagens: alto custo de fabricação e longo tempo entre a coleta das células somáticas e o transplante de células reprogramadas (três meses, no mínimo). É relevante mencionar que o uso de vetores retrovirais que se integram ao genoma pode resultar em tumorigênese (OKANO et al., 2013). Alternativas têm sido buscadas para esses problemas, como, por exemplo, a utilização de vetores episomais que não se integram ao DNA (BAGHBADERANI et al., 2015) e a transfecção direta de fatores de reprogramação nas células como mRNAs (WARREN et al., 2010) ou proteínas (KIM et al., 2009), dispensando o uso de vetores virais.

Para melhorar a eficiência da reprogramação, microRNAs (miRNAs) e outras moléculas estão sendo testados. Os miRNAs são não codificantes, mas fazem a sintonia fina da expressão gênica, desempenhando múltiplos papéis, incluindo a especificação do destino celular. Foi demonstrado que miR-302/367 pode reprogramar células somáticas humanas e de camundongos ao estado de pluripotência na ausência de fatores de transcrição (KUO et al., 2012).

São múltiplas as aplicações das iPSCs em pesquisa básica e medicina. Jiménez-Moreno e outros (2017) afirmaram que, em condições de diferenciação adequadas, é possível gerar neurônios em cultura que preservam as

propriedades de regiões específicas do cérebro. Khazaei, Ahuja e Fehlings (2017) descreveram um protocolo de obtenção de células progenitoras de neurônios espinhais, em 40 dias após o cultivo inicial. As iPSCs, sob efeito de Ativina A, podem formar células endodérmicas e estas, com proteína morfogênica do osso 2 (BMP-2) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF), sob baixa tensão de oxigênio, formam hepatócitos (SULLIVAN et al., 2010). Outra nova fronteira tecnológica da pesquisa, em medicina regenerativa e terapia celular, é a combinação das iPSCs com a edição gênica. Esta envolve estratégias como retificação, substituição ou deleção de genes alterados (XIAO-JIE et al., 2015).

Na edição de genes, utilizam-se endonucleases capazes de realizar quebras específicas da fita dupla do DNA, ativando mecanismos endógenos de reparo. Existem dois mecanismos principais de reparo: a união terminal não homóloga (*non-homologous end joining* - NHEJ) e o reparo direcionado por homologia (*homology-directed repair* - HDR). O reparo por NHEJ consiste na ligação direta das extremidades clivadas e, embora tenha acurácia, pode resultar em eventuais mutações (inserções ou deleções). Reparos via NHEJ também podem inserir códons de parada prematura no gene, resultando em nocaute. O reparo via HDR exige um molde para a reconstrução do sítio clivado. Nesse caso, usa-se um molde endógeno ou exógeno de DNA ou, até mesmo, transgenes terapêuticos (LISTIK; CARMO, 2016; SAVIĆ; SCHWANK, 2016).

É possível utilizar nucleases programáveis para a realização de quebras direcionadas e intencionais no DNA, tais como as “dedo de zinco” (*zinc fingers nucleases* – ZFNs), as meganucleases ou nucleases teleguiadas (*homing endonucleases* – HEs), as nucleases efetoras do tipo ativadoras de transcrição (*transcription activator-like effector nucleases* – TALENs) e a nuclease Cas9 associada ao CRISPR (LISTIK; CARMO, 2016). O CRISPR-Cas9 consiste, portanto, de uma nuclease (Cas9), associada a um RNA guia, que corta as fitas duplas de DNA em pontos específicos por meio dos seus domínios catalíticos RuvC e

HNH (Figura 1). Esse RNA guia é um complexo de CRISPR RNA (crRNA) e crRNA de transativação (tracrRNA). Para a ligação específica ao DNA, exige-se também a presença de um motivo adjacente ao protoespaçador (*protospacer adjacent motif* - PAM) 5'-NGG, o qual flanqueia o terminal 3' do DNA-alvo (SAVIĆ; SCHWANK, 2016; XAVIER-NETO; SAITO, 2016).

O desenvolvimento de um RNA guia único (*single-guide* RNA - sgRNA), resultante da fusão de crRNA e tracrRNA (JINEK et al., 2012), deixou o sistema mais versátil, podendo ser adaptado para outros sítios genômicos pela simples modificação da sequência do vetor de expressão do sgRNA. A presença de um único guia para a ligação ao DNA, não requerendo nenhuma engenharia laboriosa de ligação proteica, é a maior vantagem do CRISPR-Cas9 sobre os demais sistemas de edição de genes (HOCKEMEYER; JAENISCH, 2016). Também é possível utilizar múltiplas sequências de sgRNAs em um único arranjo CRISPR para permitir edição simultânea de vários sítios no genoma de mamíferos (CONG et al., 2013).

Ensaio pré-clínicos de edição de genes, por meio da tecnologia CRISPR-Cas9, têm se baseado em três abordagens diferentes: (1) edição de genes de embriões, (2) correção *in vivo* de doenças genéticas em modelos animais e (3) edição de genes de células adultas humanas *ex vivo* (SAVIĆ; SCHWANK, 2016). Wu e outros (2013) corrigiram a mutação do gene *CRYGC* que causa a catarata em embriões de camundongos. Long et al. (2014) preveniram a distrofia muscular em embriões de camundongos pela correção da mutação genética correspondente. Liang e outros (2015) corrigiram a mutação da hemoglobina β causadora de β -talassemia em embriões humanos polispérmicos, que seriam descartados em clínicas de fertilização humana (podem gerar blastocistos, mas não prosseguem no desenvolvimento). Observaram como resultado o corte eficiente de genes e a ativação das vias NHEJ e HDR de reparo, mas também mosaicismos e mutações em outros sítios. Guimarães (2016)

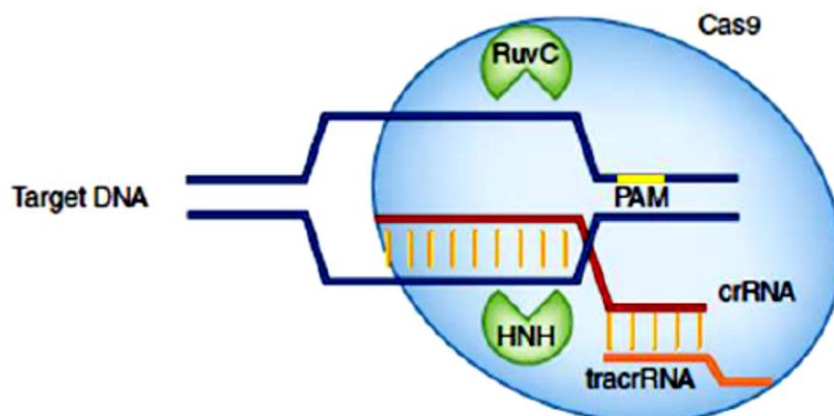


Figura 01. Ilustração esquemática do sistema CRISPR-Cas9 e sua interação com o DNA-alvo ou *Target DNA* (azul escuro). A Cas9 (azul claro) está associada ao crRNA (vermelho) e ao tracrRNA (laranja). A sequência crRNA guia o complexo até o local do corte, que será feito pelos domínios RuvC e HNH (verdes) da Cas 9 na posição três nucleotídeos a montante da sequência PAM (amarelo) (Fonte: Xavier-Neto e Saito, 2016).

entende que CRISPR-Cas9 é promissor, porém suscita cautela pelo potencial de alterar genes e criar bebês sob medida. Há autores que condenam a edição de genes de zigotos humanos pela incerteza quanto à segurança do procedimento (SAVIĆ; SCHWANK, 2016).

Um dos primeiros estudos de correção de uma doença genética *in vivo* em camundongos pós-natais foi o de Yin e outros (2014). Os autores injetaram via intravenosa os vetores codificantes para Cas9 e sgRNA, além de um molde de oligoDNA para a via de reparo HDR, a fim de corrigir a deficiência da enzima fumarilacetato hidrolase, que causa a tirosinemia hereditária do tipo I. Um exemplo de utilização de edição gênica em células adultas humanas *ex vivo* é o estudo de Xie e outros (2014), que geraram iPSCs a partir de fibroblastos de pacientes com β -talassemia homocigota e as transfectaram com vetores para CRISPR-Cas9 junto com moldes de DNA para a via de reparo HDR. As iPSC foram diferenciadas em hemácias livres da doença que poderiam ser usadas em transplantes. Firth e outros (2015) reprogramaram fibroblastos de pacientes com fibrose cística (FC) pulmonar para obtenção de iPSCs, as quais foram diferenciadas em células epiteliais respiratórias com a devida correção no gene regulador transmembrana de FC (*CFTR*).

Uma das maiores vantagens da terapia gênica *ex vivo* é a possibilidade de selecionar as melhores células geneticamente corrigidas para uso em transplantes. Portanto, o uso do CRISPR-Cas9 é menos crítico nas abordagens *ex vivo* do que nas *in vivo*. Entretanto, a edição *ex vivo* requer a expansão das células, o que pode resultar em alterações genômicas adicionais indesejadas, pois as iPSCs são particularmente propensas a sofrer mutações durante a reprogramação e expansão. A cultura de iPSCs com biorreatores apresenta melhores resultados, pois promovem um microambiente dinâmico para células suspensas, facilitando o transporte de nutrientes e também culturas de alta densidade em larga escala, com equipamentos que ocupam pouco espaço. Para promover o contato célula-célula e criar ambiente 3D, suportes e biomateriais têm sido muito utilizados (HIRSCHI; LI; ROY, 2014).

Existem estudos sobre uma tecnologia alternativa e talvez mais segura do que a indução de pluripotência: a reprogramação direta de uma célula somática em outra (SAVIĆ; SCHWANK, 2016). Apesar disso, o conhecimento sobre iPSCs/CRISPR-Cas9 continua avançando rapidamente em busca de uma exatidão cada vez maior na edição de genes. No Brasil, há vários grupos de pesquisadores nessa linha: pesquisa de leucemia em camundongos nocaute na Universidade de Campinas (UNICAMP), em parceria com a Universidade do Texas; pesquisa de *Trypanosoma cruzi* na UNICAMP, em parceria com a Universidade de Keele, no Reino Unido; pesquisa da distrofia muscular de Duchenne da Universidade de São Paulo (USP), em parceria com o museu de História Natural

em Paris; dentre vários outros sobre fissuras labiopalatais, autismo, síndrome de Marfan etc. (GUIMARÃES, 2016).

CONCLUSÃO

A partir desta revisão de literatura conclui-se que as tecnologias de iPSCs e CRISPR-Cas9 permitem a obtenção de modelos celulares de edição gênica específicos ao paciente, tornando-as promissoras na pesquisa sobre novas abordagens terapêuticas em medicina regenerativa e terapia gênica. Entretanto, tais tecnologias ainda necessitam de aprimoramento para evitar alterações genômicas indesejadas, assim como de regulamentação jurídica, para coibir manipulação gênica humana inescrupulosa.

REFERÊNCIAS

- BAGHBADERANI, A. B.; TIAN, X.; NEO, B. H.; BURKALL, A.; DIMEZZO, T.; SIERRA, G. et al. cGMP-manufactured human induced pluripotent stem cells are available for pre-clinical and clinical applications. **Stem Cells Reports**, v. 5, Oct. 15, p. 647-59, 2015.
- CAMPBELL, K. H.; McWHIR, J.; RITCHIE, W. A.; WILMUT, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**, v. 380, n. 6569, p. 64-6, 1996.
- CONG, L.; RAN, F. A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R. et al. Multiplex genome editing engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819-23, 2013.
- FIRFH, A. L.; MENON, T.; PARKER, G. S.; QUALLS, S. J.; LEWIS, B. M.; KE, E. et al. Functional gene correction for cystic fibrosis in lung epithelial cells generated from patient iPSCs. **Cell Reports**, v. 12, n. 9, p: 1385-90, 2015.
- GUIMARÃES, M. Uma ferramenta para editar o DNA. **Pesquisa Fapesp**, v. 240, p. 38-41, 2016.
- GURDON, J. B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 10, p. 622-40, 1962.
- HIRSCHI, K. K.; LI, S.; ROY, K. Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 16, Jul. 11, p. 277-94, 2014.
- HOCHMEYER, D.; JAENISCH, R. Induced pluripotent stem cells meet genome editing. **Cell Stem Cell**, May 5, v. 18, n. 5, p. 573-586, 2016.
- JIMÉNEZ-MORENO, N.; STATHAKOS, P.; CALDWELL, M. A.; LANE, J. D. Induced pluripotent stem cell neuronal models for the study of autophagy pathway in human degenerative disease. **Cells**, v. 6, n. 3, Aug. 11, 2017.
- JNEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816-21, 2012.
- KHAZAEI, M.; AHUJA, C. S.; FEHLINGS, M. G. Generation of oligodendrogenic spinal neural progenitor cells from human induced pluripotent stem cells. **Current Protocols in Stem Cell Biology**, Aug. 14, 2017, ISSN:1938-8969.

- KIM, D.; KIM, C. H.; MOON, J. I.; CHUNG, Y. G.; CHANG, M. Y.; HAN, B. S. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 6, p. 472–476, 2009.
- KUO, C. H.; DENG, J. H.; DENG, Q.; YING, S. Y. A novel role of miR-302/367 in reprogramming. **Biochemistry and Biophysical Research Community**, v. 417, n. 1, p. 417–411, 2012.
- LIANG, P.; XU, Y.; ZHANG, X.; DING, C.; HUANG, R. et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. **Protein & Cell**, v. 6, n. 5, p. 363–72, 2015.
- LISTIK, E.; CARMO, A. C. V. As características dos mecanismos e sistemas de edição genômica. **Revista Acadêmica Oswaldo Cruz**, 10. ed., ano 3, n. 10, abr.-jun., 2016. Disponível em: Revista.oswaldocruz.br/Content/pdf/Edicao_10_Listik_Eduardo.pdf. Acesso em: 06/09/17.
- LONG, C.; McANALLY, J. R.; SHELTON, J. M.; MIREAULT, A. A.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing germline DNA. **Science**, v. 345, n. 6201, p. 1184–88, 2014.
- MALI, P.; YANG, L.; ESVELT, K. M.; AACH, J.; GUELL, M.; DICARLO, J. E. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 823–6, 2013.
- OKANO, H.; NAKAMURA, M.; YOSHIDA, K.; OKADA, Y.; TSUJI, O.; NORI, S. et al. Step toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. **Circulation Research**, Feb. 1, v. 112, n. 3, p. 523–533, 2013.
- OKITA, K.; YAMAKAWA, T.; MATSUMURA, Y.; SATO, Y.; AMANO, N.; WATANABE, A. et al. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. **Stem Cells**, v. 31, p. 458–466, 2013.
- SAVIĆ, N.; SCHWANK, G. Advances in therapeutic CRISPR-Cas9 genome editing. **Translational Research**, v. 168, Feb., p. 15–21, 2016.
- SULLIVAN, G. J.; HAY, D. C.; PARK, I. H.; FLETCHER, J.; HANNOUN, Z.; PAYNE, C. M. et al. Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells. **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 329–35, 2010.
- TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–722, 2007.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. **Development**, v. 140, n. 12, p. 2457–2461, 2013.
- WADDINGTON, S. N.; PRIVOLIZZI, R.; KARDA, R.; O'NEILL, H. C. A broad overview and review of CRISPR-Cas technology and stem cells. **Current Stem Cell Report**, v. 2, p. 9–20, 2016.
- WARREN, L.; MANOS, P. D.; AHFELDT, T.; LOH, Y. H.; LI, H.; LAU, F. et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 5, p. 618–30, 2010.
- WU, Y.; LIANG, D.; WANG, Y.; BAI, M.; TANG, W.; BAO, S. et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 6, p. 659–62, 2013.
- XAVIER-NETO, J.; SAITO, A. **Geração de camundongo nocaute condicional para o receptor nuclear órgão COUP-TFII por CRISPR/Cas9**. Campinas: Laboratório Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais, 2016, 14p. (Projeto para solicitação de bolsa PIBIC/CNPq).
- XIAO-JIE, L.; HUI-YING, X.; ZUN-PING, K.; JIN-LIAN, C. et al. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. **Journal of Medical Genetics**, v. 52, n. 5, p. 289–96, 2015.
- XIE, F.; YE, L.; CHANG, J. C.; BEYER, A.I.; WANG, J.; MUENCH, M. O. et al. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. **Genome Research**, v. 24, n. 9, p. 1526–33, 2014.
- YIN, H.; XUE, W.; CHEN, S.; BOGORAD, R. L.; BENEDETTI, E.; GROMPE, M. et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. **Nature Biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 551–3, 2014.
- YU, J.; VODYANIK, M. A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J. L.; TIAN, S. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**, v. 318, (5858), p. 1917–1920, 2007.