

**P 1869****Sistema CRISPR-Cas9 para correção de mutações em células de pacientes com MPS I**

Felipe Mateus Pellenz; Talita Giacomet de Carvalho; Roberto Giugliani; Ursula da Silveira Matte; Guilherme Baldo - HCPA

Introdução: A Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença lisossômica de depósito causada por mutações no gene da  $\alpha$ -L-Iduronidase (IDUA), que leva ao acúmulo dos glicisaminoglicanos dermatan e heparan sulfato nos tecidos. É uma doença crônica, progressiva, com manifestações clínicas heterogêneas, e que ainda não tem cura. Considerando as limitações apresentadas pelas terapias existentes, a investigação de novas alternativas terapêuticas é necessária. A tecnologia CRISPR-Cas9 para edição gênica permite modificar regiões genômicas específicas por meio da clivagem da fita dupla de DNA seguida por recombinação homóloga. Este sistema tem se mostrado promissor para o tratamento de outras doenças genéticas. Objetivo: Usar o sistema de CRISPR-Cas9 para corrigir mutações pontuais em fibroblastos de pacientes com MPS I. Materiais e métodos: Fibroblastos com a mutação W402X foram transfectados com um vetor CRISPR-Cas9 construído para clivar uma região próxima à mutação, além de um oligonucleotídeo com a sequência corrigida para a recombinação homóloga. As células foram mantidas em cultura durante até 30 dias. 48 horas e 30 dias após a transfecção, a atividade de IDUA nas células e no meio de cultura foi quantificada por ensaio fluorimétrico, e os resultados foram comparados aos obtidos em fibroblastos normais e MPS I não tratados. Resultados: Os ensaios de atividade enzimática mostraram um aumento de 8 vezes na atividade de IDUA 48 h após a transfecção, quando comparadas a células não tratadas. Este valor foi de aproximadamente 10% da atividade de IDUA medida em fibroblastos de indivíduos saudáveis. A atividade enzimática no meio de cultura em que as células foram mantidas durante 48 horas após a transfecção não apresentou diferença estatística entre as células transfectadas ou não. Os fibroblastos analisados 30 dias após a transfecção mantiveram a atividade de IDUA em aproximadamente 10% da detectada em fibroblastos normais. Conclusão: Parte das células transfectadas com o sistema CRISPR-Cas9 e o oligonucleotídeo doador foi corrigida e passou a produzir a enzima deficiente nas células do paciente. A expressão da enzima se manteve estável mesmo 30 dias após o tratamento, o que indica uma correção a longo prazo. Estes resultados sugerem a potencial utilidade da edição gênica por CRISPR-Cas9 para o tratamento de pacientes com mutações de ponto causadoras de MPS I. Unitermos: Mucopolissacaridose tipo I; Edição gênica; CRISPR-Cas9