

Busca de melhores sequências de Single Guide RNA (sgRNA) para edição do gene COL1A1: uma abordagem *in silico* que visa viabilizar a criação de um modelo de cultura celular de Osteogênese Imperfeita

Daniel M. Melo¹; Sabrina R. Sarquis¹; Yasmin A. Barbosa⁴; Maira Trancozo¹; Giulia B. Martins¹; Paolla M. Luz¹; Raphael C. B. Bevitori¹; Fernanda A. Silva¹; Flavia I. V. Errera¹; Eldamária V. W. dos Santos¹; Carlos M. C. Maranduba³; Roger F. Pagotto²; Flavia de Paula¹.

Universidade Federal do Espírito Santo¹; Hospital Infantil Estadual Nossa Senhora da Glória²; Universidade Federal de Juiz de Fora³; Universidade de Vila Velha⁴

INTRODUÇÃO

A Osteogênese Imperfeita (OI) é uma doença genética rara que apresentam ampla heterogeneidade clínica e genética, caracterizada por fragilidade óssea, fraturas recorrentes, baixa estatura e deformidades esqueléticas. A classificação atual de OI se baseia em dados clínicos, radiológicos e genéticos. A maioria das mutações que causa OI ocorre nos genes que codificam a cadeia de colágeno tipo I. Mutações em outros genes relacionados com o processamento, modificações pós-traducionais, dobramento e *cross-linking* do colágeno, mineralização óssea e diferenciação osteoblástica também foram descritos. Melhorar nossa compreensão sobre os aspectos moleculares da OI poderá auxiliar na elaboração de novas estratégias de tratamento. Organismos modelos são preciosas fontes de estudo de genes e vias relacionados a doenças. Na última década, com o desenvolvimento da técnica de Repetições Palindrômicas Curtas Interespaçadas Regularmente Agrupadas (CRISPR/Cas9), foi possível planejar edições no DNA que podem auxiliar na criação de modelos de cultura celular de doenças genéticas. Um dos fatores críticos que influenciam o sucesso desta técnica é o planejamento da sequência de Single Guide RNA (sgRNA) necessária para direcionar a região alvo da edição gênica.

OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo realizar levantamento *in silico* das melhores sequências de sgRNA para edição do gene COL1A1. Os resultados desta pesquisa poderão ser utilizados para criar modelos de cultura de células tronco mesenquimais de OI no futuro.

METODOLOGIA

A análise de bioinformática foi realizada por meio das plataformas CHOPCHOP e Invitrogen™ TrueDesign™ Genome Editor com base em critérios de eficiência de clivagem e baixa probabilidade de efeitos *off-target*.

		CHOPCHOP		Invitrogen™ TrueDesign™ Genome Editor	
Sequência alvo do RNA guia	Região do gene	Mismatch	Eficiência	Off-target	Score (%)
ACAGCAGGGTACTTACGGCGGGG	Exon 44	0	69,29	0	94,01
GATACTTACGACAGCGCCAGGGG	Exon 26	0	65,63	4	85,64
CGTCTCGGTCATGGTACCTGAGG	Exon 2	0	65,53	5	81,64

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionadas três sequências de sgRNAs:
5'-ACAGCAGGGTACTTACGGCGGGG-3'
5'-GATACTTACGACAGCGCCAGGGG-3'
5'-CGTCTCGGTCATGGTACCTGAGG-3'
localizadas nos exons 44, 26 e 2 do gene COL1A1, respectivamente. Estas regiões apresentaram scores entre 81,67% e 94,01% quanto a eficiência de clivagem, tinham, no máximo, cinco regiões de potencial clivagem inespecífica e possuíam baixas chances de *mismatches*, indicando elevada especificidade.

GATACTTACGACAGCGCCAGGGG	
Off-target	Localização genômica
GATACTCAGGACAGAGCCAG	Cromossomo 15
GATACTTAGAACAGGGCCAG	Cromossomo 15
GATACTTACGATAGGGCCTG	Cromossomo 1
GATGCTTACCACAGCCCAG	Cromossomo 1

CGTCTCGGTCATGGTACCTGAGG	
Off-target	Localização genômica
TTTCTCTGTCATGGTACCTG	Cromossomo 2
TGTCTGGGTCATGGTATCTG	Cromossomo X
AGTCTCGGTGATTGTACCTG	Cromossomo 15
GGTCTGGGGCATGGTACCTG	Cromossomo 17
CGTCTCGGCCATGGTGCCCTG	Cromossomo 4

A análise comparativa entre as plataformas reforça a importância do cruzamento de dados bioinformáticos para a escolha de sgRNAs mais seguros e eficazes. A especificidade do sgRNA é crítica, pois pequenos desvios de pareamento podem induzir edições fora do alvo, comprometendo a integridade genômica e a validade dos modelos experimentais. Neste sentido, os dados obtidos apontam para sgRNAs altamente promissores na indução de *knockout* do gene COL1A1 com mínima interferência genômica indesejada.

CONCLUSÃO

Concluimos que o planejamento *in silico* de sgRNAs representa uma etapa estratégica e viável para o avanço na criação de modelos celulares de OI por meio de edição gênica. O desenvolvimento de modelos de cultura celular de OI forneceria uma fonte importante de células viável para realização de experimentos terapêuticos *in vitro*.