

CRISPR-Cas9 E SUA IMPORTÂNCIA NA SAÚDE: O QUE NÓS SABEMOS?

CRISPR-Cas9 AND ITS IMPORTANCE IN HEALTH: WHAT DO WE KNOW?

CUNHA, Geovanna Luzia¹; BERNUCCI, Lainara Maria²; COIMBRA, Juliano Rodrigues³; SILVA, Douglas Fernandes⁴.

^{1 a 4}Departamento de Enfermagem – Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos – Unifio/FEMM Ourinhos, SP, Brasil

RESUMO

Este trabalho foca no objetivo de mostrar a versatilidade dos estudos sobre a técnica de CRISPR-Cas9 que vem sendo cada vez mais aprofundado. A CRISPR é um gene que se encontra no mecanismo de defesa de bactérias contra bacteriófagos e que altera geneticamente organismos vivos; ela é capaz de modificar sequências do DNA com precisão, mas, isso traz uma série de questionamentos éticos e morais, justamente pelo fato de suas consequências ainda serem desconhecidas, portanto, a utilização desta técnica precisa ser cautelosa, com base nessas informações este trabalho se baseou em pesquisas já feitas sobre a técnica de CRISPR-Cas9 e o que se é conhecido da mesma nesse momento. Para produzir este artigo realizou-se uma pesquisa bibliográfica qualitativa e quantitativa acerca do tema. Este trabalho de revisão comprovou que a técnica estudada é uma ferramenta valiosa na área da saúde e no auxílio em diversos aspectos medicinais, possibilitando novas terapias e diagnósticos de doenças. Entretanto, ainda são necessários estudos e pesquisas para maiores inovações e aplicações na saúde.

Palavras-chave: *CRISPR-Cas9*; Edição Gênica; Genética; Biologia Molecular; Diagnósticos de Doenças.

ABSTRACT

This work focuses on the objective of showing the versatility of studies on the CRISPR-Cas9 technique that has been increasingly in-depth. CRISPR is a gene that is found in the defense mechanism of bacteria against bacteriophages and that genetically alters living organisms; it is capable of modifying DNA sequences with precision, but this brings a series of ethical and moral questions, precisely because its consequences are still unknown, therefore, the use of this technique needs to be cautious, based on this information this work is based on research already done on the CRISPR-Cas9 technique and what is known about it at this time. To produce this article, a qualitative and quantitative bibliographic research was carried out on the subject. This review work proved that the technique studied is a valuable tool in the health area and in helping in several medicinal aspects, enabling new therapies and disease diagnoses. However, studies and research are still needed for further innovations and applications in health.

Keywords: *CRISPR-Cas9*; Gene Editing; Genetics; Molecular Biology; Disease Diagnoses.

INTRODUÇÃO

A técnica molecular CRISPR vem da língua inglês Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats que significa: Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas. A primeira sequência de CRISPR foi identificada e aconteceu em um estudo na bactéria *Escherichia coli* no ano de 1987, mas ainda não era compreendida com tal nome (ISHINO *et al.*, 1987). Desde 2012, surgiu um novo sistema de edição do material genético, que utiliza uma pequena

sequência de RNA para guiar a nuclease Cas9 até a sequência específica de DNA a ser clivada: o complexo CRISPR-Cas9 (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2015).

A CRISPR-Cas9 envolve uma edição de genes que possui: um RNA como guia para corresponder ao gene alvo e Cas9 que é uma proteína associada a CRISPR, uma endonuclease causadora da quebra de fita dupla do DNA onde permite a modificação no genoma. O sistema da CRISPR-Cas9 serve para reparar mutações, onde se recupera a função gênica quanto para introduzir novas mutações, esse sistema foi proposto em edição genômica e atualmente está comercialmente disponível. RNA e a proteína Cas9 são produzidas *in vitro*, podendo ser entregue as células com diferentes mecanismos como por exemplo o uso de vetores ou agentes químicos. Os primeiros nascimentos de bebês com DNA curado com Crispr-Cas9 ocorreram na China.

Nos últimos cinco anos, o CRISPR renovou não apenas o campo da biologia molecular, mas também os campos da medicina e biotecnologia. Diferente de outras técnicas de edição genômica, possui a capacidade de atingir sequência-alvo de forma específica no sistema CRISPR-Cas9 e é dado por uma molécula de RNA e não por proteínas projetadas para cada edição específica, tornando a técnica menos complicada (POLSTEIN; GERSBACH, 2015).

Através da técnica CRISPR-Cas9 se tornou possível ter uma alteração na informação genética, promoção de reparo em um gene que está mutado e é o principal causador de uma doença, modificação com precisão genes de organismos humanos, em insetos, plantas, répteis, peixes e por fim reverter os sintomas de doença em um ser vivo (GONZAGA; RAMOS, 2018).

Com base nessas informações, o presente trabalho teve como objetivo revisar a literatura sobre a técnica de CRISPR-Cas9, conhecer seus benefícios para a área científica e a área da saúde e se atentar quanto aos desafios dessa técnica na parte maléfica, pois, suas consequências ainda são um tanto quanto desconhecidas devido ao fato deste tema ainda estar sendo estudado constantemente, com base nisso este presente trabalho trouxe dados e informações do que foi descoberto até os dias de hoje.

METODOLOGIA

Este trabalho foi produzido através de uma revisão de literatura, e os estudos foram selecionados após uma abrangente pesquisa nas bases de dados eletrônicas PubMed (*National Library of Medicine*), Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde) e Scielo (*Scientific Electronic Library Online*) e Google acadêmico.

A pesquisa nos bancos de dados foi realizada entre julho até setembro de 2022 e com o tema central: “CRISPR-Cas9 na saúde” e subdivisões: “CRISPR-Cas9”; “engenharia genética”; “terapia gênica”; “edição genômica”. Além de buscas utilizando as palavras chaves: “CRISPR-Cas9 na saúde”, “CRISPR-Cas9 em diagnóstico de doenças” e “CRISPR-Cas9 na edição genética”. Os critérios de inclusão dos artigos selecionados para a presente pesquisa foram: Artigos publicados em revistas que se encontram disponíveis nas bases de dados citados acima, artigos publicados no idioma português, espanhol e inglês no período de 2016-2022. Artigos que não retratavam sobre o tema da CRISPR-Cas9 foram excluídos por não abordarem o tema principal deste trabalho.

DESENVOLVIMENTO

A pesquisa nas bases de dados eletrônicas identificou 360 estudos no total e após análise de título e resumo, 20 foram para a etapa de revisão de texto completo e somente 12 se enquadraram nos critérios de inclusão. O Quadro 1 demonstra as características dos respectivos artigos incluídos nessa pesquisa.

Quadro 1- Resumo dos estudos incluídos.

Artigos	Intervenção	Conclusão
AREND MC & PEREIRA JO & MARKOKI MM., 2017	O artigo mencionado testou e avaliou a ferramenta de edição genômica CRISPR-Cas9 para auxiliar no tratamento da hipertensão arterial sistêmica.	Os autores concluíram que há possibilidade de uso da nova ferramenta molecular na Cardiologia, que pode ser vislumbrada e talvez, em breve, vir a beneficiar a saúde da população.

ALCANTARA RLD <i>et al.</i> , 2019	Os autores avaliaram a possibilidade do CRISPR-Cas9 na terapia gênica do câncer de pulmão, através do conhecimento do mecanismo da CRISPR-Cas9 e da sua utilização no tratamento do câncer de pulmão.	Os autores concluíram que o sistema CRISPR-Cas9 proporciona uma plataforma adequada para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas aos adenocarcinomas em condições <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> e trazer diversas possibilidades para tratar o câncer de pulmão com base na terapia gênica.
ALMEIDA ASR & SOUZA CB., 2021	Este artigo mencionado teve como objetivo descrever uma das mutações mais frequentes nos casos de Carcinoma Pulmonar de Células Não Pequenas (CPCNP), como a mutação ativadora do gene EGRF, responsável pela transformação de células normais em células neoplásicas na maioria dos adenocarcinomas, bem como a aplicabilidade da técnica do sistema CRISPR-Cas9 com alternativa terapêutica para a neoplasia pulmonar.	Os autores concluíram que a aplicação do CRISPR-Cas9 na neoplasia pulmonar como doença-alvo demonstrou-se efetiva, uma vez que a proliferação tumoral foi revertida por meio da deleção da versão mutada do gene receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Seu mecanismo simples contribui para a fácil aplicação no cenário da terapia gênica, apresentando uma alternativa terapêutica promissora nessa doença e representando a possibilidade de reduzir o sofrimento e o enfraquecimento do paciente, visto que esse método não requer tratamentos prolongados ou cirurgias invasivas para se fazer efetivo.
ALCANTARA RLD <i>et al.</i> , 2019	Os autores avaliaram a possibilidade do CRISPR-Cas9 na terapia gênica do câncer de pulmão, através do conhecimento do mecanismo da CRISPR-Cas9 e da sua utilização no tratamento do câncer de pulmão.	Os autores concluíram que o sistema CRISPR-Cas9 proporciona uma plataforma adequada para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas aos adenocarcinomas em condições <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> e trazer diversas possibilidades para tratar o câncer de pulmão com base na terapia gênica.
OLIVEIRA PC & SIMÕES GASS & FIUZA CA & NASCIMENTO GCD., 2022	O artigo mencionado identificou as possibilidades do uso da técnica de edição genética CRISPR-Cas9 para o tratamento do câncer do colo do útero.	Foi concluído pelos autores que o uso de ferramentas de modificação genética, como o CRISPR-Cas9, tem potencial de propiciar cura para lesões malignas do colo uterino, além de ter baixo custo, viabilidade e alta eficiência, se comparado aos métodos tradicionais de tratamento.
GYORGY <i>et al.</i> , 2016	O artigo referenciado investigou os efeitos fisiológicos da doença de Alzheimer, como reunir informações atualizadas sobre o RNAi e CRISPR-Cas9, e avaliaram ambos os potenciais terapêuticos na doença de Alzheimer.	Os autores concluíram que estas ferramentas de silenciamento gênico e edição genômica permitem que sejam possíveis novos tratamentos para DA através do controle da expressão de genes relacionados a sua patogênese.
SILVA MRF <i>et al.</i> , 2020	O objetivo desse artigo mencionado foi de os autores realizarem um levantamento acerca das principais perspectivas de cura desta doença utilizando o sistema CRISPR-Cas9. Este trabalho foi uma revisão bibliográfica nas bases eletrônicas nacionais e internacionais na língua portuguesa e inglesa. Visto que esta patologia ainda não possui cura apenas tratamento, o sistema CRISPR-Cas9 surgiu como uma terapia promissora, assim como a terapia com células-tronco mensênquimais	Os autores do artigo relacionado concluíram em vista que esta é uma patologia de cunho genético, e que o CRISPR-Cas9 associado a terapia com células mensênquimais pluripotentes se mostrou como uma ferramenta versátil e eficaz no tratamento do diabetes mellitus tipo 1 (DM1) No entanto, faz-se necessárias novas pesquisas capazes de induzir estratégias para o melhoramento de alterações genéticas e maior eficiência do efeito terapêutico.

	<p>pluripotentes (MSC), as quais possui a funcionalidade, principalmente, de reparação e sobrevivência de células β das ilhotas pancreáticas, as MSCs possuem a capacidade de modificação do microambiente das áreas de lesão pancreática, anulando a destruição autoimune contra as células β podendo restaurar a normoglicemia do paciente.</p>	
<p><i>SIQUEIRA AP et al., 2021</i></p>	<p>O estudo dos autores abordou as diferentes aplicações da ferramenta de edição gênica “<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>” (CRISPR) e “<i>crispr associated protein-9</i>” (Cas9) na caracterização, prevenção, susceptibilidade genética, diagnóstico e terapêutica da diabetes mellitus (DM)</p>	<p>O estudo mostrou que o sistema CRISPR-Cas9, apesar de algumas limitações técnicas e éticas, é promissor em virtude de sua sensibilidade e especificidade, sendo uma alternativa aos métodos clássicos para compreensão das bases genéticas e fisiopatológicas da DM e que permite desenvolver e aplicar modelos de estudo aplicados à elucidação de novas e mais eficientes estratégias de diagnóstico e tratamento.</p>
<p><i>BATISTA FCC & NUNES CP., 2019</i></p>	<p>O principal foco de estudo desse artigo mencionado está direcionado para analisar as atuais opções terapêuticas para tratar o HIV-1 usando a tecnologia CRISPR-Cas9, além de analisar a evolução na engenharia genética, estudaram o mecanismo desse método e suas controversas. O CRISPR é produto de anos de um objetivo da comunidade científica de alterar o gene para benefícios, e atualmente as pesquisas com CRISPR se encontram em pesquisa de animais com bons resultados e notícias especulativas, porém o CRISPR apresenta certas limitações para chegar ao local de ação.</p>	<p>Os autores concluíram que o futuro das terapias para erradicar o vírus HIV-1 está caminhando para uma resolução a partir da tecnologia do CRISPR-Cas9, ou seja, utilizando esse mecanismo para evitar a proliferação do vírus do HIV nas células, as pesquisas ainda estão em testes animais, porém com ótimos resultados, também se tem notícia de gêmeas que após uma cirurgia genética foram totalmente imunizadas de adquirir o vírus, todavia ainda é uma especulação que não possui comprovação científica.</p>
<p><i>XIAO Q & GUO D & CHEN S., 2019</i></p>	<p>Os autores retratam que o CRISPR-Cas9 foi projetado como uma tecnologia de edição de genes eficaz com potencial para tratar o vírus da imunodeficiência humana HIV-1/AIDS. Ele pode ser usado para direcionar cofatores celulares ou genoma do HIV-1 para reduzir a infecção pelo HIV-1 e eliminar o provírus, bem como para induzir a ativação transcricional do vírus latente em reservatórios virais latentes para eliminação.</p>	<p>O trabalho nos mostra que esta versátil tecnologia de edição de genes foi aplicada com sucesso na prevenção e redução do HIV-1/AIDS em células humanas e modelos animais.</p>
<p><i>HUANG Z et al., 2017</i></p>	<p>A principal razão para a persistência do HIV/AIDS é a incapacidade dos tratamentos existentes de limpar ou erradicar os múltiplos reservatórios de HIV que existem no corpo humano. Para suprimir a replicação e o rebote do vírus, os pacientes com HIV/AIDS devem tomar medicamentos antivirais por toda a vida.</p>	<p>O sistema de repetições palindrômicas agrupadas regularmente interespaçadas CRISPR- associado a nuclease 9 (Cas9) é uma técnica emergente de edição de genes com o potencial de eliminar ou interromper genomas integrados ao HIV ou células infectadas pelo HIV de vários reservatórios de HIV, o que pode resultar na cura completa do HIV/AIDS.</p>

<p>OLIVEIRA LNM & SERPELONI BB & SIMIONI PU, 2022</p>	<p>O artigo mencionado buscou uma alternativa no tratamento da talassemia, o propósito da terapia gênica que é expandir a produção de hemoglobina fetal, isolando as células-tronco dos pacientes a partir do sangue periférico. Em seguida, o CRISPR-Cas9 atuou silenciando o gene BCL11A, modificando as células e causando o aumento da produção de hemoglobina fetal. As células que foram editadas são então transfundidas para o paciente após passarem pelo condicionamento mieloblastivo da medula óssea, promovendo a reposição das hemoglobinas funcionais e a substituição das hemoglobinas defeituosas.</p>	<p>As pesquisas realizadas no artigo envolvendo o uso da tecnologia de CRISPR-Cas9 para tratamento da talassemia beta tem se mostrado promissoras até o momento, entretanto, permanece em estudo, devido à ausência de evidências que mostrem que o seu uso não afete bases nitrogenadas fora do alvo, ocasionando efeitos off-target. Equiparado aos mecanismos convencionais de edição gênica, que aplicam vírus como fonte do material genético a ser inserido no genoma, o CRISPR-Cas9 pode realizar alterações direcionadas e precisas no DNA de células vivas e tem sido promissor para atuar como terapia gênica em indivíduos portadores de hemoglobinopatias. A fim de que a sobrevivência de pacientes portadores de talassemia beta seja garantida, são necessárias transfusões sanguíneas regulares, com a finalidade de manter os níveis de hemoglobina adequados e reduzir as deformidades ósseas.</p>
---	---	--

É possível verificar que todos os artigos incluídos nesta pesquisa comprovaram a importância do estudo na técnica de CRISPR-Cas9 e a sua eficiência nos casos de diversas doenças, sejam as citadas acima como outras que também estão em estudo para uma possível solução.

A técnica de CRISPR-Cas9 é considerada promissora para a resolução de diversas doenças genéticas, como, por exemplo a DM1 que é uma doença incurável, ou seja, uma patologia que precisa de tratamento para a vida toda (VASCONCELOS E FIGUEIREDO, 2015). Diversos avanços têm sido reportados na área da saúde e com o auxílio da biologia molecular, como os estudos de XIAO Q e GUO D & CHEN (2019) que avaliaram o combate ao HIV pelo emprego do sistema CRISPR. Já em 2022, OLIVEIRA *et al.* (2022) buscam o tratamento da talassemia com a ajuda da CRISPR-Cas9.

A técnica CRISPR obtém um elevado potencial para revolucionar conceitos e métodos usados atualmente na área da medicina. Porém, ainda se tem os aspectos fisiológicos, químicos, e éticos, que precisam ser analisados, este é um dos exemplos de como a biotecnologia pode ser uma aliada para melhorar as condições de saúde pública. Com base a esses esforços coletivos da comunidade científica, talvez, futuramente, tenhamos um novo método seguro e eficaz para tratamento das doenças que hoje são considerados um desafio a sociedade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta revisão de literatura ficou demonstrado que o sistema CRISPR-Cas9, como terapia gênica, é uma ferramenta valiosa na área da saúde e no auxílio em diversos aspectos medicinais. Para tanto, ficou evidente que inúmeras pesquisas na área de biologia molecular estão sendo feitas, desta forma, esta biotecnologia está cada vez mais aplicada na sociedade e para a busca da qualidade de vida. Este trabalho serve como base para futuras revisões a fim de comparar o desenvolvimento do sistema nos próximos anos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UNIFIO.

REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, R. L. DE *et al.* A Tecnologia De Crispr-Cas9 Na Terapia Gênica Do Câncer De Pulmão. **Revista Brasileira Militar De Ciências**, v. 5, n. 13, p. 11, 2019.
- ALMEIDA, A. S. R.; SOUZA, C. B. CRISPR-Cas9 system: an alternative therapy for lung cancer. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 57, p. 1-8, 2021.
- AREND, M. C.; PEREIRA, J. O.; MARKOSKI, M. M. The CRISPR/Cas9 System and the Possibility of Genomic Edition for Cardiology. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** [online]. v. 108, n. 1, p. 81-83, 2017.
- BARBOZA, C. M. S. *et al.* A Técnica De Crispr-Cas9 Na Terapia Gênica: uma revisão da literatura. **Revista Transformar**, v. 14, n. 1, p. 562–698, 20 set. 2020.
- BATISTA, F. C. C.; NUNES, C. P. Crispr Cas9: Atuais Aplicações No Tratamento Do Hiv. **Revista de Medicina de Família e Saúde Mental**, v. 1, n. 1, p. 3, 2019.
- BERNARDES, V. A. *et al.* A utilização da técnica de CRISPR-CAS9 na Terapia Gênica. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. e75101421778–e75101421778, 25 out. 2021.
- DE OLIVEIRA, Poliane Camila, G. A. DOS S. S.; FIUZA, Camila Alves *et al.* **Utilização De Crispr Para Tratamento Do Câncer Do Colo Do Útero**. TCC (Gradação em Biomedicina. 1 jul. 2022. <https://repositorio.animaeducacao.com.br/bitstream/ANIMA/24267/1/TCC%20CRISPR%20FINAL%2030.06.2022.pdf> . Acessado em 04 de outubro de 2022.

GONZAGA, G. C. *et al.* Técnica Crispr-Cas9 E Sua Utilização Na Área Laboratorial. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**, v. 25, n.2, p. 96-99, 2018.

HUANG, Z. *et al.* Current application of CRISPR/Cas9 gene-editing technique to eradication of HIV/AIDS. **Gene Therapy**, v. 24, n. 7, p. 377–384, jul. 2017.

OLIVEIRA, L. N. M. DE; SERPELONI, B. B.; SIMION, P. U. Terapia Gênica Para Portadores De Talassemia Beta Através Do Sistema Crispr/Cas 9. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 13, n. 10, 2022.

POLSTEIN, Lauren R; A GERSBACH, Charles. A light-inducible CRISPRCas9 system for control of endogenous gene activation. **Nature Chemical Biology**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.198-200, 2015.

PRADO, M.S.G.; SOUZA, C. B. RNA de interferência e CRISPR/Cas9 como alternativas terapêuticas para a doença de Alzheimer: uma Revisão de Literatura | **Conexão Ciência** (Online). [s.d.]. v. 16, n.2, p. 75-87, 2021.

REIS, É. V. B.; OLIVEIRA, B. T. DE. Crispr-Cas9, Biossegurança E Bioética Uma Análise Jusfilosófica-Ambiental da Engenharia Genética. **Veredas do Direito: Direito Ambiental e Desenvolvimento Sustentável**, v. 16, n. 34, p. 123–152, 31 maio 2019.

SILVA, M. R. F. DA *et al.* CRISPR/Cas9 como perspectiva de cura para o Diabetes mellitus tipo 1. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, p. e9691210709–e9691210709, 14, 2020.

SIQUEIRA, A. P. *et al.* Diabetes Mellitus: Perspectivas para diagnóstico e terapêutica a partir de edição genética por CRISPR-CAS9. | Diabetes Mellitus: Perspectives for diagnosis and therapy based on CRISPR-CAS9 genetic editing. **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, v. 8, n. 15, p. 32–40, 2021.

VASCONCELOS, M. J. V. DE; FIGUEIREDO, J. E. F. **Tecnologia CRISPR-Cas para edição genômica**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2015.

XIAO, Q.; GUO, D.; CHEN, S. Application of CRISPR/Cas9-Based Gene Editing in HIV-1/AIDS Therapy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p.1-15, 2019.