

EDIÇÃO DO DNA E AS PERSPECTIVAS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS POR CRISPR-Cas9

DNA EDITING AND THE PROSPECTS FOR DISEASE TREATMENT WITH CRISPR-Cas9

¹DEFREITAS, Paola Moraes; ²GATTI, Luciano Lobo; ³RASMUSSEN, Lucas Trevizani.

^{1a3} Departamento de Biomedicina - Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos - Unifio/FEMM Ourinhos, SP, Brasil

RESUMO

O descobrimento da técnica CRISPR-Cas9 representou um grande avanço na história da biotecnologia e medicina, trazendo grandes evoluções para a pesquisa genética e tratamento de doenças, incluindo distúrbios genéticos. O método se destaca pelo baixo custo e precisão na edição do genoma, entretanto, ainda levanta questões éticas e preocupações sobre possíveis erros. Esta pesquisa teve como objetivo revisar a literatura sobre a tecnologia CRISPR-Cas9, explorando seus princípios, aplicações em medicina e ciência, e seus limites éticos. Neste estudo, foi realizada uma revisão narrativa, utilizando as bases de dados *SciELO*, *PubMed*, *ScienceDirect* e Google Acadêmico, com artigos de 2014 à 2023, levantando a exploração do CRISPR-Cas9, suas aplicações terapêuticas em doenças complexas, como a manipulação de genes relacionados ao câncer e os desafios existentes quanto à entrega eficiente da técnica, bem como as questões éticas, as quais trazem implicações sobre a edição de genes na linhagem germinativa, com implicações para futuras gerações. De modo geral, é descrita como uma "tesoura molecular", que permite a secção de duas fitas da dupla hélice do DNA através da enzima Cas-9, possibilitando a inserção de um novo trecho, a substituição de elementos na cadeia de DNA ou a correção de erros genéticos. O caso do cientista He Jiakui, o qual criou bebês geneticamente modificados, evidenciou a necessidade de regulamentações éticas rigorosas. Considerando a análise apresentada, é uma técnica com grande potencial, a qual promete grande eficiência em seus resultados, porém, traz consigo uma série de inquietações éticas.

Palavras-chave: CRISPR-Cas9; Câncer; Mutação Genética; Terapia Gênica.

ABSTRACT

The discovery of the CRISPR-Cas9 technique represented a significant breakthrough in the history of biotechnology and medicine, bringing major advancements to genetic research and the treatment of diseases, including genetic disorders. The method stands out for its low cost and precision in genome editing, yet it still raises ethical questions and concerns about potential errors. This research aimed to review the literature on CRISPR-Cas9 technology, covering its principles, medical and scientific applications, and ethical boundaries. In this study, a narrative review was conducted using the *SciELO*, *PubMed*, *ScienceDirect*, and *Google Scholar* databases, with articles from 2014 to 2023, exploring CRISPR-Cas9, its therapeutic applications in complex diseases, such as the manipulation of cancer-related genes, and the existing challenges regarding the efficient delivery of the technique, as well as ethical issues, which have implications for gene editing in the germline, with implications for future generations. Generally, it is described as a "molecular scissors" that allows the cutting of two strands of the DNA double helix through the Cas-9 enzyme, enabling the insertion of a new segment, the replacement of elements in the DNA chain, or the correction of genetic errors. The case of scientist He Jiankui, who created genetically modified babies, highlighted the need for strict ethical regulations. Considering the presented analysis, it is a technique with great potential, promising high efficiency in its results, but it brings with it a series of ethical concerns.

Keywords: CRISPR-Cas9; Cancer; Genetic Mutation; Gene Therapy.

INTRODUÇÃO

A descoberta da técnica CRISPR-Cas9 foi um marco na história da biotecnologia e medicina (Sganzerla *et al.*, 2020). O método tem demonstrado ser verdadeiramente

revolucionário, exibindo um amplo potencial para pesquisa e medicina genética, proporcionando esperança para o tratamento de inúmeras doenças, como distúrbios genéticos raros, bem como doenças complexas, como o câncer. Sua precisão na leitura e edição do genoma, com baixo custo, tendo em vista a tecnologia de edição genética, pode resolver problemas genéticos de longa data, evitando-os. Assim, essa técnica abre inúmeras possibilidades para a solução de desafios que anteriormente eram considerados irreversíveis. Porém, visto os inúmeros riscos, a possibilidade de erros é alarmante, sobretudo quanto a ética (HUPFFER *et al.*, 2020).

É dito como tesoura molecular, por ser capaz de seccionar duas fitas da dupla hélice do DNA através da enzima Cas-9, possibilitando a inserção de um novo trecho (SGANZERLA *et al.*, 2020).

Foi nos anos 80 que o pesquisador Ishino, juntamente a seus colaboradores observaram uma sequência específica do gene *iap* presente na bactéria *Escherichia coli*, onde encontraram uma estrutura inusitada. Após isto, identificaram repetições semelhantes através do sequenciamento aleatório de todo o genoma em outras numerosas bactérias. Essas sequências de repetição agrupadas e regularmente interespaçadas por sequências interativas únicas de comprimento constante, foi nomeada de "*Short Regular Spaced Repeats (SRSRs)*" (LINS *et al.*, 2018).

Desta forma, o nome CRISPR refere-se a uma seção de DNA em bactérias e arqueas, e também a técnica que utilize genes desta seção como ferramenta na edição do genoma. Funciona como um sistema de defesa, quando um bacteriófago infecta uma célula, ele insere o DNA viral que é introduzido no DNA bacteriano, justamente no local denominado CRISPR. Através desse mecanismo, os ataques do bacteriófago são registrados ao longo do tempo, criando um arquivo de infecção, desta forma, o organismo obtém a capacidade de reconhecer o mesmo agressor em possíveis reinfecções futuras, possibilitando uma rápida resposta imunológica (Martinez-Olivia, 2020).

Já em meados do século 21, as pesquisadoras Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna, iniciaram uma pesquisa para compreender como as bactérias atacam as infecções virais. Durante este estudo, evidenciaram que as bactérias possuem um sistema imunológico adaptativo, intitulado CRISPR, que lhes concede detectar o DNA viral e destruí-lo. No passar das pesquisas, identificaram uma proteína encontrada na *Streptococcus Pyogenes*, denominada Cas9, capaz de buscar, clivar e degradar o DNA do vírus. E com o estudo dessa proteína, Cas9, constataram que poderiam usá-la como

ferramenta para edição de genomas (Liberalesso *et al.*, 2021). Com isso, ganharam o Prêmio Nobel de Química de 2020.

Uma preocupação central são os desafios éticos, pois além da capacidade de editar genes em prol do tratamento de doenças genéticas, debate questões morais profundas, como o fato da alteração da natureza humana, trazendo consigo os limites sobre a intervenção humana na evolução biológica. Outro ponto é a inquietação da edição de genes em embriões humanos, levantando questionamentos com a possibilidade de intervenções permanentes na linhagem.

O objetivo deste estudo foi realizar uma pesquisa com caráter de revisão de literatura a respeito da tecnologia CRISPR-Cas9, abrangendo seus princípios de funcionamento, aplicações na área da medicina, ciência e seus limites éticos.

METODOLOGIA

Este estudo trata-se de uma revisão bibliográfica, onde foram usados como fonte de pesquisas artigos científicos do banco de dados SciELO (*Scientific Electronic Library Online*), PubMed (*National Institutes of Health*), *Science Direct* e Google Acadêmico. Foi realizada uma busca por artigos em português, espanhol e inglês, entre os anos de 2014 à 2023, termos como “*CRISPR-Cas9*”, “*gene therapy*”, “*CRISPR-Cas9 câncer*”, “*mutação genética*” e “*terapia gênica*” foram utilizados como palavras-chaves. Os critérios de inclusão dos artigos selecionados para a presente pesquisa foram:

- Artigos sobre CRISPR-Cas9 e suas aplicações.
- Publicações em português, inglês ou espanhol.
- Artigos publicados em revistas indexadas nas bases de dados mencionadas.

DESENVOLVIMENTO

A TÉCNICA CRISPR-CAS9

O CRISPR consiste em sequências espaçadoras únicas delineadas por sequências curtas, repetitivas e palindrômicas, que codificam proteínas Cas (Kolli *et al.*, 2017). Esse sistema foi sugerido para desempenhar funções no reparo e na regulação do DNA, bem como proteção contra agentes estranhos, como vírus, em procariontas (Lins *et al.*, 2018).

Para editar o genoma, cientistas uniram uma única molécula quimérica contendo o crRNA e o tracrRNA, conhecida como sgRNA ou gRNA. Sendo assim, o sgRNA apresenta duas características básicas: uma sequência de 20-25 nucleotídeos na posição 5' - que se junta a sequência específica do DNA-alvo, e uma sequência repetida complementar no crRNA e tracrRNA, que se pareiam formando uma dupla fita em grampo, composta de 42 nucleotídeos conservados, essencial para o reconhecimento da enzima Cas9. Além disto, o sistema de edição de genomas baseado em *S. pyogenes* contém outra sequência finalizadora de transcrição, em grampo, composta por 40 nucleotídeos. Essa construção é suficiente para gerar a associação entre crRNA, tracrRNA e a enzima Cas9, formando um complexo direcionado ao sítio específico do DNA-alvo, desenvolvendo a clivagem da dupla fita de DNA (Vasconcelos *et al.*, 2015).

O complexo crRNA:tracrRNA:Cas9 desliza pela fita do DNA invasor até encontrar a sequência PAM apropriada, que se localiza logo abaixo da sequência-alvo, na cadeia complementar (não alvo) do DNA genômico. Após isso, a Cas9 promove a abertura da dupla cadeia de DNA na posição imediatamente acima da PAM, possibilitando o pareamento do sgRNA com a cadeia de DNA complementar ao *spacer* do crRNA (Anders *et al.*, 2014; Sternberg *et al.*, 2014).

Os domínios HNH e RuvC, com atividade de nuclease em Cas9, realizam a clivagem de forma precisa do DNA no terceiro nucleotídeo adjacente a PAM, induzindo a dupla quebra (DSB) na molécula de DNA invasora. DSBs iniciadas por CRISPR-Cas9 podem ser corrigidas pelos mecanismos DNA NHEJ ou HDR os quais reparam o DNA. Comumente, o NHEJ gera mutações aleatórias (*indels*), podendo ser deleções ou inserções de diferentes tamanhos, ocasionando em alterações na janela de leitura e levando ao *knockout* gênico ou à interrupção de elementos regulatórios em *cis* nos promotores ou em sequências *enhancers* (Vasconcelos *et al.*, 2015)

APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DO SISTEMA CRISPR-CAS9

A edição é através da clivagem de ambas as cadeias de DNA alvo, seguido do desencadeamento de um dos dois mecanismos de reparo do DNA: reparo dirigido por homologia (HDR) que é disposto a erros na inserção ou exclusão de uma sequência específica de DNA, podendo modificar a expressão de proteínas, ou o mecanismo de junção final não homóloga (NHEJ) que inclui a recombinação homóloga com sequências de DNA doador no DNA alvo (Braga *et al.*, 2023)

O estudo da CRISPR-Cas9 também está sendo utilizada em vírus com genoma de DNA ou os quais revelam uma fase de DNA em seu ciclo de vida. Desta forma, é possível a pesquisa de estudos bem sucedidos de edição nos genomas de alguns vírus, como o da hepatite B, papilomavírus, herpesvírus, vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (Castrignano, 2017).

Há dois tipos celulares de terapia gênica: linhagem germinativa, onde alterações genéticas são herdadas, e a linhagem somática, limitando as modificações de um paciente sem impactar nas futuras gerações. Essa abordagem tem grande potencial na luta contra doenças genéticas. O rápido avanço do CRISPR-Cas9 proporcionou a realização de testes translacionais em células somáticas humanas, as primeiras aplicações com ênfase no âmbito terapêutico, descrevem etapas de otimização para segurança e eficácia do sistema (Gonçalves *et al.*, 2017).

Segundo Silva *et al.* (2020), a grande maioria dos casos de doenças genéticas aos quais não se aplicam métodos de tratamento de reposição ou alimentação, a alternativa mais eficaz é a modificação genética das células *ex vivo* em cultura, que decorrente serão transplantadas. Essas células geneticamente modificadas podem estimular o sistema imunológico e até mesmo sintetizar moléculas terapêuticas para melhora do estado clínico do paciente.

CRISPR-CAS9 NA TERAPIA DO CÂNCER

O câncer é uma das principais causas de mortalidade associada às doenças, com incidência crescente em todo o mundo. Ao mesmo tempo, registraram-se progressos na prevenção e no tratamento de muitos tumores malignos, conduzindo a uma sobrevivência prolongada ou mesmo à cura (Zhan *et al.*, 2019). Os avanços tecnológicos, como a tecnologia de edição de genoma mediada por CRISPR-Cas9, permitem manipular com precisão quase qualquer sequência genômica, permitindo a elucidação funcional dos genes envolvidos na carcinogênese e a correção de mutações causadoras do câncer. No entanto, apesar das suas vantagens e potencial, a forma como as ferramentas de edição CRISPR-Cas9 é eficientemente entregues às células-alvo *in vivo* e como evitar ou reduzir efeitos não intencionais fora do alvo, continuam a ser grandes desafios, que são cruciais para as suas aplicações clínicas (Chen *et al.*, 2019).

Diferentes conceitos de terapia de câncer mediada por CRISPR/Cas9, incluindo manipulação de genes relacionados a tumores, imunoterapia tumoral, modelagem de

pesquisa de tumores e superação de resistência a medicamentos anticâncer, são estabelecidos em vários tipos de câncer. Para alcançar um tratamento eficaz e preciso do câncer, os componentes CRISPR/Cas9 devem ir diretamente para as células-alvo, passando por diferentes barreiras físicas. Além disso, o processo de edição genética necessita do transporte da proteína Cas9 funcional e do sgRNA para o núcleo ao mesmo tempo (Xu *et al.*, 2021).

A descoberta e o desenvolvimento de medicamentos constituem um processo longo e complexo de identificação de novos medicamentos e de sua colocação no mercado. Geralmente, esse processo começa com a hipótese de que perturbar um alvo biológico específico resultará um efeito benéfico que mudará o curso de uma doença. (Martinez-Lage *et al.*, 2018).

Complementando esta abordagem, o câncer de mama triplo negativo (TNBC), caracterizado pela sua alta malignidade e heterogeneidade, não existem terapias direcionadas ao mesmo. Os inibidores de *bromodomain BET* (BBDIs) são um medicamento potencial para tratar o TNBC, mas a resistência inerente e adquirida dos tumores ao BBDIs limita sua aplicação clínica (Wang *et al.*, 2022).

Estudos conduzidos por Shu *et al.* (2020), identificaram uma interação letal sintética com BBDIs e genes que conferem resistência aos BBDIs quando deletado. Os resultados apontaram que os inibidores de CDK4/6 e o paclitaxel apresentam forte sinergia entre os BBDIs, enquanto a ausência dos componentes do complexo SFN/SWI resulta em resistência aos BBDIs. Decorrente disto, o sequenciamento de RNA unicelular em linhas celulares sensíveis e resistentes aos BBDIs mostrou um alto grau de heterogeneidade entre as amostras, indicando que a resistência aos BBDIs pode ser tanto pré-existente quanto adquirida.

DESAFIOSÉTICOS

Durante o século XX, a humanidade testemunhou um período de medos e esperanças em relação às intervenções genéticas no ser humano. Cada nova avanço tecnológico no campo genético, originava uma nova onda de preocupações e esperanças para o futuro. Já no fim do século XX, uma notícia surpreendeu o mundo: o nascimento da ovelha Dolly, o primeiro clone de um animal adulto, fruto de anos de pesquisas liderada pelos geneticistas Ian Wilmut e Keith Campbell, em Edimburgo, na Escócia. Trouxe um levantamento em torno das questões éticas sobre clonagem humana, uso de células-tronco embrionárias e produção de embriões para pesquisa (Sganzerla *et al.*, 2020).

No que se diz terapias genéticas “somáticas” e “germinativas”, é necessária uma distinção. A linha germinal representa de início uma “linha extraordinária”, é fácil ver a diferença entre terapia em crianças ou adultos, modificações intencionais na linhagem germinativa. O historiador de ciência Nathaniel Comfort escreveu “não são usadas para tratar doenças num indivíduo, mas para preveni-las (ou diminuir o risco) em indivíduos futuros”, porém, isto depende até certo ponto, do tipo de modificação da linhagem germinativa (Foht, 2016).

Em 26 de novembro de 2018, o cientista chinês, He Jiankui chocou a comunidade científica do mundo todo ao anunciar a criação dos primeiros bebês geneticamente modificados do mundo, foram implantados em uma mulher que deu a luz à duas meninas gêmeas chamadas Lulu e Nana, para que elas se tornassem resistentes ao vírus HIV, impedindo o desenvolvimento do HIV, eliminando a doença. Após o anúncio, as principais instituições mundiais de ciências e medicina reagiram vigorosamente, condenando essa execução “científica” e evidenciando a necessidade de criar proteções éticas e legais para que não se repitam experimentos como esses (Sganzerla *et al.*, 2020).

Sabe-se que em um dos embriões, ambas as cópias CCR5 foram inativadas (Nana), enquanto no segundo apenas uma foi modificada (Lulu). Sendo assim, apenas Nana tem a chance de estar protegida da infecção pelo HIV no futuro, ao menos das principais variantes do vírus que entram nas células através da ligação ao receptor CCR5. Kiran Musunuru, um cardiologista e professor de medicina da universidade de Pensilvânia disse que os primeiros bebês da geração “CRISPR-Cas9”, infelizmente não nasceram como resultado de uma “conquista científica histórica, mas sim de um fiasco ético histórico”. O escândalo internacional colocou He em prisão domiciliar, e em seguida, em uma pena de prisão de 3 anos, do qual já foi liberto (Gostimskaia, 2022).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica revolucionária CRISPR-Cas9 oferece uma série de possibilidades para pesquisa e medicina genética, trazendo consigo novas perspectivas para o tratamento de doenças, até o câncer. Além do baixo custo, promete eficiência na edição do genoma, proporcionando resoluções de desafios que antes eram considerados irreversíveis, porém, apesar de seu comprometimento, traz consigo uma série de inquietações éticas sobre possíveis erros. O caso das gêmeas modificadas na China serviu como um alerta para a comunidade científica. De modo geral, é um método com

grande potencial terapêutico, mas é necessário o equilíbrio de seus benefícios com uma reflexão ética cuidadosa e regulamentação rigorosa.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UNIFIO.

REFERÊNCIAS

- ANDERS, C. et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 569-573, 2014. DOI: 10.1038/nature13579.
- BERNARDES, V. A. et al. The use of CRISPR-CAS9 Technique in Gene Therapy. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, e75101421778, 2021. DOI: 10.33448/RSD-V10I14.21778.
- BRAGA, L. et al. **Aplicações da edição de genes CRISPR-Cas9 na terapia genética da fibrose cística, 2023**. Disponível em: <https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/41193>
- CASTRIGNANO, S. B. **Enzimas em biologia molecular**. III. Tecnologia CRISPR-Cas9, 2017. DOI: 10.1126/science.1258096.
- CHEN, M. et al. CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges. **Cancer Letters**, v. 447, p. 48-55, 2019. DOI: 10.1016/J.CANLET.2019.01.017.
- DE FÁTIMA, C. et al. CRISPR-Cas9. **Anais de Saúde Coletiva**, v. 1, n. 1, p. 13-15, 2021. DOI: 10.33448/RSD-V10I14.21778.
- FOHT, B. Gene Editing: New Technology, Old Moral Questions. **The New Atlantis**, n. 48, p. 3-15, 2016.
- GISSELA MARTINEZ-OLIVA, B. **Crispr, una herramienta para editar genomas**, 2021. DOI: 10.47993/gmb.v43i2.66.
- GONÇALVES, G. A. R.; PAIVA, R. de M. A. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. **Einstein** (São Paulo, Brazil), v. 15, n. 3, p. 369-375, 2017. DOI: 10.1590/S1679-45082017RB4024.
- GÓMEZ-TATAY, L.; AZNAR, J. CRISPR-CAS9. El mayor avance en técnicas de edición genética requiere una reflexión ética. **Cuadernos de Bioética**, v. 30, n. 99, p. 171-185, 2019. DOI: 10.30444/CB.31.
- GOSTIMSKAYA, I. CRISPR–Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 87, n. 8, p. 777, 2022. DOI: 10.1134/S0006297922080090.
- HUFFPFER, H. M.; BERWIG, J. A. A tecnologia CRISPR-CAS 9: da sua compreensão aos desafios éticos, jurídicos e de governança. Pensar - **Revista de Ciências Jurídicas**, v. 25, n. 3, 2020. DOI: 10.5020/2317-2150.2018.9722.

JIANG, F.; DOUDNA, J. A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. **Annual Review of Biophysics**, v. 46, p. 505-529, 2017. DOI: 10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-062215-010822/CITE/REFWORKS.

KOLLI, N. et al. Application of the gene editing tool, CRISPR-Cas9, for treating neurodegenerative diseases. **Neurochemistry International**, v. 112, p. 187-196, 2018. DOI: 10.1016/J.NEUINT.2017.07.007.

LINS, A. A. et al. Edição genética associada ao uso da nova técnica CRISPR/Cas9, ferramenta de defesa utilizada pelas bactérias contra DNA invasor. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 4, n. 3, p. 358-367, 2018. DOI: 10.21674/2448-0479.43.358-367.

MA, Y.; ZHANG, L.; HUANG, X. Genome modification by CRISPR/Cas9. **The FEBS Journal**, v. 281, n. 23, p. 5186-5193, 2014. DOI: 10.1111/FEBS.13110.

OLIVEIRA, B. de A. et al. Vetores virais para uso em terapia gênica. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 9, n. 2, p. 57-66, 2018. DOI: 10.5123/S2176-62232018000200008.

SGANZERLA, A.; PESSINI, L. Edição de humanos por meio da técnica do Crispr-cas9: entusiasmo científico e inquietações éticas. **Saúde Em Debate**, v. 44, n. 125, p. 527-540, 2020. DOI: 10.1590/0103-1104202012519.

SHU, S. *et al.* Synthetic Lethal and Resistance Interactions with BET Bromodomain Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer. **Molecular Cell**, v. 78, n. 6, p. 1096-1113.e8, 2020. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.04.027.

STERNBERG, S. H. *et al.* DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. **Nature**, v. 507, n. 7490, p. 62-67, 2014. DOI: 10.1038/nature13011.

VILAÇA DE VASCONCELOS, M. J. *et al.* **Tecnologia CRISPR-Cas para Edição Genômica. Embrapa Milho e Sorgo**, 2015.

WANG, S. W. et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer. **Molecular Cancer**, v. 21, n. 1, p. 1-27, 2022. DOI: 10.1186/s12943-022-01518-8.

XU, X. et al. Nanotechnology-based delivery of CRISPR/Cas9 for cancer treatment. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 176, p. 113891, 2021. DOI: 10.1016/j.add.2021.113891.

ZHAN, T. et al. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 55, p. 106-119, 2019. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.04.001.