A TÉCNICA DE CRISPR-Cas9 NA TERAPIA GÊNICA: uma revisão da literatura

THE CRISPR-Cas9 TECHNIQUE IN GENE THERAPY: a literature revision

LA TÉCNICA CRISPR-Cas9 EN TERAPIA GENÉTICA: una revisión de literatura

Caroline Mota Souza Barboza
Graduada em Biomedicina pelo Centro Universitário São José de Itaperuna - UNIFSJ.

Marcella Martins Terra
Bacharel em Biomedicina/UNIPAC-JF, Mestre em Saúde Brasileira - Faculdade de Medicina/UFJF, Doutora em Saúde Brasileira - Faculdade de Medicina/UFJF.

Maria Luísa Candido Ribeiro
Graduada em Biomedicina pelo Centro Universitário São José de Itaperuna - UNIFSJ, Pós-graduanda em Hematologia e Imunologia (FAVENI).

Jacksiane Brandão Silva
Graduada em Biomedicina pelo Centro Universitário São José de Itaperuna - UNIFSJ.

Resumo: As técnicas para edição genômica, inicialmente, tinham como fundamento a averiguação de áreas específicas do DNA. Diante dos avanços nas pesquisas, foi identificada uma nova técnica de edição gênica, capaz de modificar sequências de DNA de forma precisa, a CRISPR-Cas9. Com isso, surgiu a possibilidade de identificar terapêuticas que se beneficiem da tecnologia CRISPR-Cas9. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o uso desta tecnologia na terapia gênica, assim como apresentar algumas das doenças que poderiam ser tratadas por ela, e abordar questões éticas envolvidas nos processos de edição gênica em humanos. Para isso, foi realizada uma revisão integrativa da literatura, com pesquisas em fontes seguras, artigos no idioma de inglês e português. Ao final, pode-se concluir que o sistema CRISPR-Cas9 é uma opção promissora para as terapias gênicas, porém deve ser usada com cautela, levando em consideração as questões éticas que envolvem as técnicas de edição gênica.

Palavras-chave: CRISPR, terapia gênica, edição genômica.

Abstract: The techniques for genomic editing were initially based on the investigation of specific areas in the DNA. In view of advances in research, a new gene editing technique was identified, capable of modifying DNA sequences in a precise way, CRISPR-Cas9. Therewith, the possibility arose to identify therapies that benefit from CRISPR-Cas9 technology. Therefore, the present work aims to evaluate the use of this technology in gene therapy, as well as to present some of the diseases that could be treated by it, and to

address ethical issues involved in the processes of gene editing in humans. Thereunto, an integrative literature review was carried out, with research on safe sources and articles in english or portuguese. After all, it can be concluded that the CRISPR-Cas9 system is a promising option for gene therapies, however it must be used with caution, taking into account the ethical issues that involve the techniques of gene editing.

Keywords: CRISPR, gene therapy, gene editing.

Resumen: Las técnicas para la edición genómica se basaron inicialmente en la investigación de áreas específicas de ADN. En vista de los avances en la investigación, se identificó una nueva técnica de edición de genes, capaz de modificar secuencias de ADN de manera precisa, CRISPR-Cas9. Con eso, surgió la posibilidad de identificar las terapias que se benefician de la tecnología CRISPR-Cas9. Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el uso de esta tecnología en la terapia génica, así como presentar algunas de las enfermedades que podrían ser tratadas por ella y abordar cuestiones éticas involucradas en los procesos de edición de genes en humanos. Con este fin, se realizó una revisión bibliográfica integradora, con investigaciones sobre fuentes seguras, artículos en inglés y portugués. Al final, se puede concluir que el sistema CRISPR-Cas9 es una opción prometedora para las terapias génicas, sin embargo, debe usarse con precaución, teniendo en cuenta los problemas éticos que implican las técnicas de edición génica.

Palabras clave: CRISPR, terapia génica, edición genômica.

Introdução

A técnica de edição gênica conhecida como CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) foi descoberta em 1987 por pesquisadores japoneses através de análises realizadas no genoma de bactérias *Escherichia coli* (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014 *apud* ISHINO, 1987). Mais tarde, o CRISPR foi detectado em inúmeras bactérias e arqueias, e foram feitas previsões sobre seus possíveis papéis no reparo do DNA ou na regulação de genes (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; REIS, OLIVEIRA, 2019).

Nos últimos cinco anos, o CRISPR renovou não apenas o campo da biologia molecular, mas também os campos da medicina e biotecnologia. Após a primeira aplicação bem sucedida da tecnologia em modificações genéticas de mamíferos, cientistas de todo o mundo participaram positivamente do desenvolvimento dessa tecnologia com diversas áreas de pesquisa (LIU et al., 2018).

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). As nucleases Cas se tornam específicas ao patógeno por uma propriedade exclusiva da enzima, que é o requisito para uma sequência de gRNA (RNA guia) que ativa a enzima e direciona seletivamente a nuclease para sequências complementares de DNA. Esta propriedade das proteínas Cas levou à sua aplicação como uma nuclease de alta fidelidade para produzir quebras ou cortes de DNA em praticamente qualquer local desejado no DNA genômico *in vivo*. Dentre as nucleases Cas, a Cas9 se tornou a mais amplamente estudada e amplamente utilizada (CONG et al., 2013; MALI et al., 2013; FRIEDLAND, 2013; DICKINSON, 2013; CAI et al., 2016).

Ao contrário das outras técnicas de edição genômica, a capacidade de atingir sequência-alvo de forma muito específica do sistema CRISPR-Cas9 é dada por uma molécula de RNA e não por proteínas projetadas para cada edição específica, tornando a técnica bem menos complicada (POLSTEIN; GERSBACH, 2015). Em pesquisas sobre vias de reparo e redefinição do DNA, pôde-se constatar que as células possuem um maquinário de reparação para restaurar rompimentos na fita de DNA que gerariam alterações desta. A partir desta conclusão, Pode-se observar que, através da fragmentação, era possível realizar modificações em uma região-alvo específica. Com isso, houve certa curiosidade em desenvolver técnicas de engenharia genética que empreguem esse método (MICHELS, 2017).

As terapias gênicas visam a modificação do material genético através da reparação de genes mutados ou alterações em sítios específicos com o objetivo de realizar um tratamento. Porém, até os dias atuais, essas terapias gênicas somente existem no âmbito laboratorial, de pesquisas, e sua utilização ainda é experimental (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

Partindo da necessidade de identificar doenças ou terapias que se beneficiem da tecnologia CRISPR-Cas9, o trabalho em questão tem como objetivo avaliar o uso desta tecnologia na terapia gênica, assim como analisar algumas doenças que envolvem o material genético e poderiam utilizar as

terapias gênicas envolvendo o CRISPR-Cas9 e abordar questões éticas envolvidas nos processos de edição gênica em humanos.

Foi realizada uma revisão integrativa da literatura, com pesquisas em fontes seguras como PubMed, Scielo, ScienceDirect e Google Acadêmico, artigos nos idiomas inglês e português, utilizando as palavras chaves: CRISPR, Cas9, gene therapy e therapy, utilizando como critério de inclusão artigos publicados no período de 2012 a 2019, nas línguas portuguesa e inglesa, que possuam conteúdo dentro do tema tratado na revisão e de exclusão o ano de publicação do artigo sendo inferior a 2012 e a não existência de conteúdo sobre o assunto tratado na revisão. Espera-se, ao final, evidenciar algumas das terapias gênicas que utilizam-se da tecnologia CRISPR-Cas9 como método de tratamento para doenças que atingem o genoma humano.

1. Funcionamento do CRISPR-Cas9

O complexo CRISPR-Cas9 é um mecanismo do sistema imune de bactérias e arqueobactérias contra invasores, como bacteriófagos e plasmídeos de DNA. A memória imunológica aparece depois que o DNA invasor é cortado em fragmentos curtos e integrado ao CRISPR *locus*, passando a ser denominado como protoespaçador. (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). Após o incorporamento dos fragmentos no *locus* CRISPR do DNA bacteriano, será construída uma cadeia de pre-crRNA (cadeia precursora de RNA não-codificante). As cadeias de pre-crRNA em repetição passam por hibridação, em conjunto com um RNA não-codificante, o *trans-activating CRISPR RNA* (tracrRNA), e formam uma cadeia dupla de RNA que será fragmentada e processada pela *host factor ribonuclease* (RNase) III. O crRNA e tracrRNA formam um conjugado e ligam-se à nuclease Cas9, se agrupando em um complexo que é responsável por identificar e eliminar o DNA invasor nas células procariotas (Figura 1) (MARRAFFINI; BARRANGOU, 2015; CONG et al., 2013; MALI; ESVELT; CHURCH, 2013).

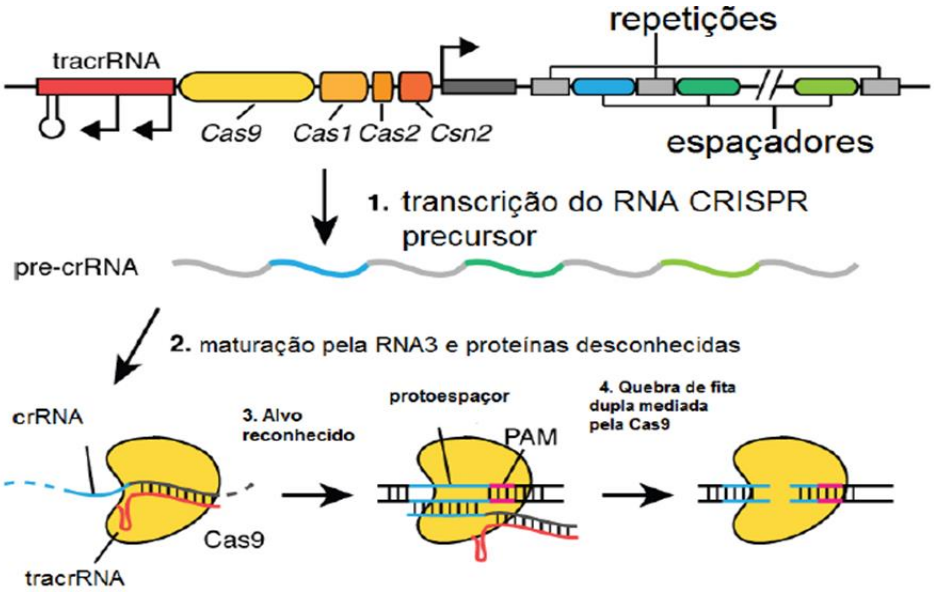

Figura 1 - Esquematização dos *loci* Cas e CRISPR de *Streptococcus pyogenes* e funcionamento de um Sistema CRISPR-Cas9. (Fonte: MICHELS, 2017)

Este novo complexo formado tem o crRNA como espaçador e é próprio para uma sequência alvo, agregando-se a esta sequencia por complementaridade e trazendo em sua companhia a Cas9. A enzima Cas9 contém um sítio de reconhecimento (REC) do complexo crRNA:tracrRNA e o sítio NUC, que apresenta ação de nuclease, e o sítio de reconhecimento da sequência *Proto-spacer Adjacent Motive* (PAM) (JINEK et al., 2014; NISHIMASU et al., 2014). No entanto, o lobo NUC, detém dois domínios diferentes com atividade de nuclease: a região HNH do complexo fragmenta a cadeia complementar e a região RuvC fragmenta a cadeia não complementar, acarretando em incisuras na dupla cadeia de DNA (Figura 2) (RICHTER et al, 2012). Tal evento ocorre apenas se a sequência alvo estiver numa região próxima a uma sequência PAM (SANDER; JOUNG, 2014).

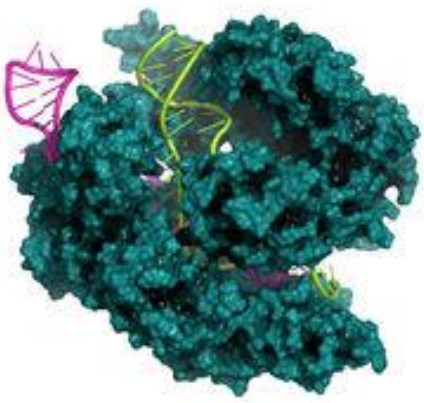

Figura 2 – Estrutura tridimensional do complexo CRISPR- Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. (Fonte: FreeArt, 2019)

No ano de 2012, Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna lideraram uma pesquisa na qual desenvolveram uma adaptação do CRISPR, o sistema CRISPR-Cas9 tipo II, derivado do sistema imune de *Streptococcus pyogenes*, para edição genômica. Neste sistema, após a fusão do crRNA com o tracrRNA, acontece a formação do *single guide RNA* (sgRNA), que recruta a proteína Cas9 para lugares específicos no genoma por meio de pareamento de bases (JINEK et al., 2012).

2. Sistema CRISPR nas Células Somáticas Eucariontes

Apesar de promissora, ainda é um desafio para os pesquisadores saber como introduzir o sistema CRISPR-Cas9 em células somáticas eucariontes. É necessário o desenvolvimento de métodos específicos e eficazes para que seja possível inserir as ferramentas de edição nos sítios previamente planejados para serem atingidos (JINEK et al., 2013; KHAN et al., 2016).

Um dos vetores mais utilizados para incorporar um fragmento de DNA exógeno em células procariontes e células resistentes a transferência por plasmídeos são os virais (SHUI et al., 2016). Alguns adenovírus e vírus adeno-associados (AAVs) (JINEK et al., 2013) possuem a habilidade de agregar no material genético da célula alvo um fragmento de DNA exógeno (ZHOU et al., 2014), entretanto, o DNA viral desaparece depois de alguns ciclos de mitose (MAGGIO et al., 2014). Devido a sua propriedade episssomal, alta capacidade de clonagem e tradução em diversas linhas celulares e a facilidade de produção, o potencial de aplicação destes vetores é bastante alto. Em ensaios *in vitro* foi possível observar que os adenovírus dispõem de uma boa conexão entre a eficiência de empacotamento e o tamanho do vírus, todavia, quando empregado *in vivo,* pode levar a uma intensificação da resposta imunitária no hospedeiro, tendo aumento das citocinas inflamatórias e capacidade de causar apoptose de células (RAN et al., 2015; WANG et al., 2015).

O tamanho diminuído deste gênero viral gera dificuldades no empacotamento do gene da Cas9, porém este problema consegue ser resolvido com a utilização de uma Cas9 procedente de uma bactéria

Staphylococcus aureus, ainda que menor, comprovou ter a mesma efetividade da Cas9 da *Staphylococcus pyogenes*, não alterando o número de mutações off-target (fora do alvo) (RAN et al., 2015).

Outro vetor seriam as ribonucleoproteinas (RNP), que têm grande mobilidade e transmissão nas células alvo, estabelecendo uma ferramenta alternativa aos vetores virais. Os vetores virais encontram uma expressão duradoura de Cas9 e RNA guia (gRNA) nas células, confrontando altas taxas de mutações off-target em muitas das vezes. A entrega direta de RNP, acompanhada da Cas9 associada ao gRNA, possibilita uma forma eficiente de evitar este problema. Instantaneamente após a injeção, as RNP introduzem as modificações na região alvo, degradando-se em seguida. Complementarmente, o emprego de RNP evita a possibilidade de inclusões de DNA indesejadas (HENDEL et al., 2015; SHUI et al., 2016).

As RNP são originalmente entregues por microinjeção direta, tendo como opção também a técnica de eletroporação ou os lipossomas catiónicos (ZURIS et al., 2015). A inserção de RNP numa cultura de células sincronizadas em uma fase característica do ciclo celular aumenta as taxas de sucesso da técnica (SHUI et al., 2016).

Outra opção seria recorrer à construção de nanopartículas de carga positiva a partir da conjugação da Cas9, gRNA e proteínas de penetração celular com a habilidade de entregar a Cas9 e o gRNA no núcleo das células-alvo eucarióticas, protegendo a viabilidade celular também (RAMAKRISHNA et al., 2014).

3. Terapias Gênicas e o Sistema CRISPR-Cas9

Grande parte das doenças, principalmente as de origem genética, não apresentam o tratamento adequado nos dias atuais. Com isso, iniciaram-se diversas pesquisas no âmbito genético, com o objetivo de desenvolver terapias para curar essas disfunções conhecidas como terapia gênica, que consiste em realizar a transferência de genes “saudáveis” para células afetadas de pacientes com o objetivo de tratar doenças. Tradicionalmente, as estratégias de terapia gênica incluem interferir na expressão do gene alvo, substituir os

genes responsáveis, corrigir mutações genéticas, entre outros (LIU et al., 2018; GONÇALVES; PAIVA, 2017).

Especificamente, a terapia gênica refere-se à manipulação de sequências gênicas e ao estímulo de mutações de exclusão para fornecer função protetora no hospedeiro. Nos dias atuais, a aplicação da técnica de CRISPR-Cas9 se expandiu para uma variedade de áreas da saúde humana, sendo usada inclusive na agricultura. Na terapia gênica, um gene com propriedades patológicas pode ser modificado por abordagens *ex vivo* e *in vivo*. Na abordagem *ex vivo*, a população de células alvo é removida do corpo do paciente e as nucleases projetadas são usadas para induzir as alterações desejadas e depois devolvidas ao paciente por enxerto, reduzindo respostas imunes acentuadas. Evitar problemas como rejeição de transplantes e respostas imunes são benefícios importantes desse método. Usando terapia gênica *in vivo*, os fatores de modificação genômica, como nucleases e padrões programáticos, são colocados diretamente no paciente (REZAEI et al., 2019).

Devido às amplas possibilidades de aplicação do sistema CRISPR-Cas9 na saúde humana, algumas doenças especificas são de maior interesse para avançar nos estudos usando tal técnica, como doenças cardíacas, respiratórias, virais, genéticas, osteoartite e câncer, principalmente por essas doenças atualmente serem de difícil tratamento.

3.1. *Doenças Cardíacas*

Considerado um dos principais problemas de saúde pública, as doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de mortalidade nos países ocidentais. A melhoria sucessiva nas técnicas de edição genômica como o sistema CRISPR-Cas9, trouxe a possibilidade de desenvolver estratégias específicas para o tratamento dessas doenças, permitindo avanços na medicina cardiovascular (VERMERSCH et al., 2019; LIM, 2017).

Porém, para que haja a possibilidade de aplicação do sistema CRISPR-Cas9 em doenças cardiovasculares (DCV), deve-se fazer uma investigação aprofundada sobre os possíveis alvos moleculares voltados à doença. Alguns laboratórios de pesquisa, nos dias atuais, estão usufruindo da técnica de CRISPR-Cas9 para edição dos genes referentes às DCV e realizando testes

em sistemas celulares e estudos clínicos. Ainda que o âmbito cardiovascular seja bastante difícil, certas disfunções poderão estar mais ou menos associadas a alguns produtos gênicos, os quais interagem com outras moléculas conhecidas, colaborando com a disponibilidade de aplicação do CRISPR-Cas9 (VERMERSCH et al., 2019; AREND et al., 2017).

A alta dos níveis de LDL (*Low Density Lipoproteins*) é um dos maiores problemas relacionados à doença arterial coronariana (DAC). Diversas pesquisas estão sendo conduzidas, focadas na inibição da pró-proteína convertase subtilisina tipo 9 (PCSK9), que facilita a destruição de receptores do LDL, levando a alterações dos níveis da lipoproteína no sangue. Por meio da técnica de CRISPR-Cas9, estudiosos estimularam o desaparecimento da função do gene da PCSK9 no fígado de camundongos, usando adenovírus como vetores, e obtiveram uma considerável baixa nos níveis de colesterol em mais de 40%. Estudos desse tipo mostram que o complexo CRISPR-Cas9 é acessível para remodelar a função de genes associados a DCV, contribuindo com a utilização desta ferramenta molecular para outros métodos que se referem a DCV (AREND et al., 2017).

Outra possível aplicação do CRISPR-Cas9 é no sistema β-adrenérgico, um dos encarregados pela manutenção da pressão arterial, do ritmo cardíaco e da vasoconstrição e vasodilatação. Juntamente, o sistema renina-angiotensina-aldosterona também participa na preservação do equilíbrio hemodinâmico. Os dois sistemas são controlados por uma ampla rede de órgãos efetores, como hormônios e peptídeos, receptores, proteínas quinases e enzimas, que atuam no ambiente extracelular e no interior das células. Sendo assim, seria pertinente testar e avaliar a edição gênica através do CRISPR para colaborar com o tratamento da hipertensão arterial sistêmica (AREND et al., 2017).

3.2. *Doenças Genéticas*

Doenças genéticas são, geralmente, causadas por desequilíbrios no código genético humano. As alterações causadas por esses desequilíbrios podem compreender a troca de um nucleotídeo em um gene, o acréscimo ou eliminação de parte de um cromossomo ou até cromossomo inteiro. Consequentemente, a síntese dos produtos acaba mudando, sendo aumentada

ou desaparecendo, levando a alterações nas rotas metabólicas e aplicações fisiológicas do portador dessa anomalia (MICHELS, 2017).

O sistema CRISPR possibilita a supressão da expressão de alguns genes mutados e, teoricamente, amenizar a patologia associada a mutações do DNA. O complexo CRISPR-Cas9 pode ser conduzido ao gene mutante, sendo utilizado para a diminuição da expressão destes genes por meio de mecanismos de reparação, induzindo a inativação dos genes mutados (YANG et al., 2016).

3.2.1. Câncer

Câncer é uma doença caracterizada por uma série de alterações genéticas e epigenéticas, que, geralmente, resultam na ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores tumorais. Devido à complexidade de seu mecanismo, as terapias atuais contra o câncer são limitadas, enfatizando a alta necessidade de abordagens terapêuticas alternativas (KHAN et al. 2016). Com a tecnologia CRISPR-Cas9, é possível manipular quase qualquer sequência genômica, permitindo a elucidação funcional de genes envolvidos na carcinogênese e a correção de mutações causadoras de câncer (CHEN et al., 2019).

Considerado um progresso na pesquisa do câncer, o CRISPR-Cas9 vem se tornando uma ferramenta de edição de genes favorável para tratamentos precisos. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que essa tecnologia pode ser um grande potencial no tratamento do câncer através da edição de proto-oncogens ou dos genes supressores de tumor, além de ser uma ferramenta para avaliar estratégias direcionadas aos medicamentos quimioterápicos, visando identificar novas vias para reduzir ou eliminar a resistência a quimioterapia, já que a resistência a esses medicamentos são a principal razão da baixa eficácia dos tratamentos atuais para pacientes com câncer (JIANG et al., 2019; SANCHES-RIVERA; JACKS 2015).

Uma possibilidade de tratamento seria a correção de mutações genéticas em genes específicos do sistema imune, gerando imunidade adaptativa eficiente para suprimir os mecanismos do câncer. No ramo das

pesquisas já foi possível identificar um considerável número de oncogenes envolvidos na origem de processos oncológicos (KHAN et al., 2016).

Alterações epigenéticas, como a desacetilação de histonas e a metilação de DNA, controlam a expressão e a inibição gênica, o que determina a diferenciação e proliferação celular. O sistema CRISPR pode ser utilizado para editar curtos erros genéticos envolvidos no silenciamento ou expressão gênica (THAKORE et al., 2016).

3.3. *Infecções Virais*

A contaminação viral em células eucariotas ocorre através de receptores específicos e, depois da endocitose, o genoma viral é transcrito, replicado e traduzido para a formação de novos fragmentos virais. Para tanto, alguns genomas de retrovírus e vírus de DNA são incorporados ao genoma celular. Conhecendo a essência de funcionamento do complexo CRISPR-Cas9, há uma alta capacidade terapêutica em doenças virais que mantém seu material genético na célula hospedeira (LIJUAN et al., 2015).

No caso do HIV, uma das técnicas para combater a infecção latente seria orientar as nucleases, como a Cas9, para o fragmento de DNA alvo que está incorporado ao genoma dos linfócitos T infectados. Em uma das pesquisas, o complexo CRISPR-Cas9 foi direcionado para a área de *Long Terminal Repeats* (LTR) do genoma viral nos linfócitos TCD4 (LIAO et al., 2015). A destruição da região LTR pela ação da Cas9 resulta numa depreciação da carga viral, junto à eliminação do vírus latente (RAMOS, 2016).

A Tabela 1 mostra o mecanismo de ação que poderia ser utilizado para realizar o tratamento de algumas infecções virais, através da técnica de CRISPR-Cas9, evidenciando o gene, RNA ou proteínas a serem modificadas.

Tabela 1- Doenças virais alvo da CRISPR/Cas9. HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana); HPV (Papilomavírus Humano); CCR5 (chemokine receptor 5); LTRs (Long Terminal Repeats); cDNA (circular DNA); EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen). (Fonte: Adaptado de RAMOS, 2016).

INFECÇÃO VIRAL	REGIÃO-ALVO DA CRISPR-CAS9	MECANISMO DE AÇÃO
HIV	Gene CCR5 Região LTR	Extração do CCR5 Destruição dos LTR
Hepatite B	cDNA	Destruição do cDNA intra-hepático

HPV	Gene E6 e E7	Destruição das proteínas E6 e E7 e aumento de supressores tumorais
Mononucleose	**Gene EBNA I e EBNA 3C**	**Destruição e silenciamento dos genes**

3.4. *Doenças Respiratórias*

As doenças respiratórias, que são as principais causas de mortalidade e morbidade no mundo, são disfunções da nasofaringe, traqueia, brônquios, pulmão e cavidade pleural (BAI et al., 2018).

O sistema de edição CRISPR-Cas9 permite criar mecanismos experimentais como linhagens celulares e animais *Knockout* genéticos de forma muito eficaz, o que é altamente valioso para determinar os mecanismos da doença. Até agora, as linhas celulares editadas pelo CRISPR ajudaram a validar o papel dos genes envolvidos na produção de surfactantes pulmonares, o envelhecimento das células epiteliais na DOPC (Doença de Obstrução Pulmonar Crônica), a inflamação e fibrose nas células epiteliais nasais e pulmonares. As deleções do CRISPR ajudaram a elucidar o processo de diferenciação de células progenitoras basais humanas primárias a organoides e epitélio mucociliar *in vitro*, o que poderia auxiliar os esforços para gerar esses tipos de tecido para fins de pesquisa ou futura terapia celular (MOSES; KAUR, 2019; BAI et al., 2018).

As interrupções mediadas pelo CRISPR também foram influentes no estudo da FC (Fibrose Cística). A FC é uma condição recessiva causada por mutações no gene do regulador transmembranar da FC (CFTR). A proteína CFTR atua como um canal de cloreto, crítico para a homeostase do volume líquido da superfície das vias aéreas. Além dos vazamentos de CFTR, o CRISPR provou ser particularmente útil para criar mutações definidas de CFTR em modelos de células e animais. Esses modelos não apenas ajudam a descobrir os mecanismos da FC em indivíduos com alterações genéticas não caracterizadas, mas também fornecem um sistema para descobrir novos alvos terapêuticos e rastrear tratamentos viáveis (MOSES; KAUR, 2019).

3.5. *Osteoatrite*

A osteoartrite (OA) é considerada uma doença que leva à perda de cartilagem, podendo haver remodelação anormal e atrito de osso subarticular, osteófitos, frouxidão ligamentar, enfraquecimento dos músculos periarticulares e distensão e inflamação sinovial. Metabolicamente, está relacionada à regulação positiva aberrante dos genes nos tecidos articulares. Por exemplo, controla-se a regulação positiva do fator de crescimento nervoso (NGF) e da interleucina-1β (IL-1β) na OA, e a metaloproteinase da matriz 13 (MMP13) é uma colagenase dominante expressa na cartilagem da OA, da qual todos desempenham papéis importantes na fisiopatologia da doença (ZHAO et al., 2019; BERENBAUM, 2013).

Portanto, a remoção desses genes oferece uma opção atraente para tratar a OA de maneira completa e duradoura. Pesquisadores exploraram a edição de genes mediada por CRISPR para tratar a OA, visando genes que codificam NGF, IL-1β ou MMP13 em um modelo induzido cirurgicamente em camundongos. Os resultados demonstraram que o direcionamento para IL-1β ou MMP13 reduziu a progressão da OA pós-traumática (PTOA) e a ablação por NGF diminuiu significativamente a dor da PTOA, mas acelerou o dano articular. É importante ressaltar que a combinação de direcionamento de IL-1β e MMP13 no cenário de direcionamento de NGF resultou em efeitos paliativos semelhantes na dor que o bloqueio de NGF sozinho, mas minimizou seus efeitos colaterais na estrutura articular (ZHAO et al., 2019).

No contexto das formas genéticas da OA, incluindo aquelas com um padrão de transmissão Mendeliano causado por mutação, bem como a forma de início tardio da doença resultante de polimorfismos de risco, a capacidade de substituir prontamente alelos oferece escopo para estudos funcionais rápidos baseados em células, tecidos e organismos. Em outras pesquisas, são analisadas formas para reparar a OA, como, por exemplo, a modulação direcionada da expressão gênica nas células articulares oferece espaço para atenuar os processos inflamatórios e degenerativos da doença, ao mesmo tempo em que permite o aprimoramento das vias anabólicas para estimular o novo crescimento da cartilagem (ALMARZA et al., 2017).

4. Questões Éticas

A engenharia genética sempre se relacionou com diversas polêmicas bioéticas e jurídicas, devido ao fato de os progressos e descoberta acontecerem de forma muito acelerada, evidenciando-se entre essas a técnica de edição do genômica conhecida como CRISPR-Cas9 (REIS; OLIVEIRA, 2019; BERGEL, 2017).

Supostamente, tanto células somáticas quanto germinativas estão aptas a receberem terapias gênicas, entretanto, a modificação de células somáticas produz alterações e consequências apenas no indivíduo sujeito à terapia. Já nas células germinativas o risco é mais alto, pois a modificação dos gametas pode converter-se em alterações indeterminadas, como malformações e outras doenças ainda desconhecidas, que seriam transmitidas às futuras gerações (REIS; OLIVEIRA, 2019).

Devido aos riscos que as técnicas podem apresentar, foi necessário estabelecer limites baseados em documentos internacionais como a Declaração Universal sobre o Genoma Humano e os Direitos Humanos (1997), a Declaração Internacional sobre os Dados Genéticos Humanos (2004), e recentemente, a Cúpula Internacional sobre Edição Genética Humana/Washington DC (2015), com o objetivo de determinar regras específicas para estes tipos de estudos. Nacionalmente, existem a Constituição da República Federativa do Brasil de 1988 (CRFB), que garante a integridade e variabilidade da herança genética e a Lei sobre Biossegurança nº 11.105/20055, que proíbe alterações em células reprodutivas. Contudo, em países como o Reino Unido e a China, modificações em células reprodutivas humanas podem ser legalmente realizadas (VIVANCO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2017).

Com os avanços nas técnicas de edição do material genético, pode haver certas mudanças na “autocompreensão ética da espécie”, o que pode levar à quebra da noção existencial. Com isto, há uma preocupação exacerbada com o entendimento de si mesmo pela pessoa geneticamente alterada (HABERMAS, 2016). Pode ser visto como favorável contribuir com a saúde do indivíduo através das modificações no genoma, mas esta é uma linha muito tênue para definir o que é bom, preferível ou ruim (REIS; OLIVEIRA, 2019).

Inovações na área da biologia molecular com certeza apresentam conquistas sem precedentes, permitindo construir formas de vida inovadoras. A questão que se evidencia não é a de usar ou não este poder e sim até que ponto pode-se ir através dele. Grandes evoluções já foram alcançadas, entretanto, os riscos do surgimento uma neo-eugenia ainda são cogitados, assim como a utilização de alteração genômica para questões estéticas, atribuição de habilidades especiais, a impossibilidade de escolha sobre essas alterações no DNA pelas gerações futuras, entre outros, são questões a serem consideradas para que não haja problemas entre os progressos atuais e os efeitos advindo dele no futuro (VIVANCO et al., 2018; BERGEL, 2017).

Considerações Finais

Como descrito, a técnica de CRISPR-Cas9 é uma promissora ferramenta de edição gênica podendo ser utilizada em diversas finalidades, desde o uso no tratamento de doenças genéticas ao uso na agricultura, porém, existem diversas questões envolvidas na realização das terapias para tratamento de patologias em humanos.

Uma destas questões seria sobre o benefício advindo da alteração do genoma. Como o CRISPR-Cas9 é uma técnica muito nova, ainda não se tem grande conhecimento sobre todos os efeitos a partir da substituição da região mutada através do CRISPR. Essas alterações, como mostrado durante a revisão, vêm sendo altamente benéficas e corrigem as disfunções genéticas que levavam à doença, mas não é conhecido se, à longo prazo, o material genético continuaria a ser expresso do modo correto, se a região corrigida volta a se alterar ou altera outras regiões do DNA que podem causar outros malefícios.

Ainda há muito que se estudar sobre o CRISPR-Cas9, porém, é inegável que há grande potencial de terapêutico para a técnica e isso incentiva os pesquisadores a buscar ainda mais desenvolver novos tratamentos através deste método.

O profissional biomédico, como pesquisador, tem grande papel nesse desenvolvimento, pois através dos conhecimentos de biologia molecular e genética, pode trabalhar em laboratórios que realizem pesquisas em

engenharia genética e adicionar ideias relevantes sobre novas formas de utilização da técnica com mais segurança e efetividade.

Referências

ALMARZA, D. et al. **Genome editing for human osteoarthritis–a perspective**. Osteoarthritis and cartilage, v. 25, n. 8, p. 1195-1198, 2017.

AREND, Marcela Corso et al. **O Sistema CRISPR/Cas9 e a possibilidade de edição genômica para a cardiologia**. Arq. Bras. Cardiol. ol, v. 108, p. 81-83, 2017.

BAI, Yichun et al. **Gene editing as a promising approach for respiratory diseases**. Journal of medical genetics, v. 55, n. 3, p. 143-149, 2018.

BERENBAUM, F. **Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!)**. Osteoarthritis and cartilage, v. 21, n. 1, p. 16-21, 2013.

BERGEL, Salvador Darío. **El impacto ético de las nuevas tecnologías de edición genética**. Revista Bioética, v. 25, n. 3, 2017.

CAI, Liquan et al. **CRISPR-mediated genome editing and human diseases**. Genes & diseases, v. 3, n. 4, p. 244-251, 2016.

CHEN, Minjiang et al. **CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges**. Cancer letters, v. 447, p. 48-55, 2019.

CONG, Le et al.. **Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems**. Science, v. 339, n. 6121, p. 819-823, 2013.

DICKINSON, Daniel J. et al. **Engineering the Caenorhabditis elegans genome using Cas9-triggered homologous recombination**. Nature methods, v. 10, n. 10, p. 1028, 2013.

DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle. **The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9**. Science, v. 346, n. 6213, p. 1258096, 2014.

FRIEDLAND, Ari E. et al. **Heritable genome editing in C. elegans via a CRISPR-Cas9 system**. Nature methods, v. 10, n. 8, p. 741, 2013.

FreeArt. **CRISPR-CAS9 gene editing complex from *Streptococcus pyogenes***. Disponível em: https://www.freeart.com/artwork/art-print/crispr-cas9-gene-editing-complex-from_fa21696427.html. Acesso em: 30 de novembro de 2019.

GONÇALVES, Giulliana Augusta Rangel; PAIVA, Raquel de Melo Alves. **Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas**. Einstein (São Paulo), v. 15, n. 3, p. 369-375, 2017.

HENDEL, Ayal et al. **Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells**. Nature biotechnology, v. 33, n. 9, p. nbt. 3290, 2015.

ISHINO, Yoshizumi et al. **Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product.** Journal of bacteriology, v. 169, n. 12, p. 5429-5433, 1987.

JIANG, Chunyang et al. **Applications of CRISPR/Cas9 Technology in the Treatment of Lung Cancer.** Trends in molecular medicine, 2019.

JINEK, Martin et al. **A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity**. Science, v. 337, n. 6096, p. 816-821, 2012.

JINEK, Martin et al. **RNA-programmed genome editing in human cells**. Elife, v. 2, p. e00471, 2013.

JINEK, Martin et al.. **Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation**. Science, v. 343, n. 6176, p. 1247997, 2014.

KHAN, Faheem Ahmed et al. **CRISPR/Cas9 therapeutics: a cure for cancer and other genetic diseases.** Oncotarget, v. 7, n. 32, p. 52541, 2016.

LIAO, Hsin-Kai et al. **Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells**. Nature communications, v. 6, p. 6413, 2015.

LIJUAN, Yin et al. **The application of CRISPR-Cas9 gene editing technology in viral infection diseases.** Hereditas, 2015.

LIM, Gregory B. **Gene therapy: Human genome editing in heart disease**. Nature Reviews Genetics, v. 18, n. 10, p. 580, 2017.

LIU, Huayi et al. **Blossom of CRISPR technologies and applications in disease treatment.** Synthetic and Systems Biotechnology, v.3, p. 217–228, 2018.

MAGGIO, Ignazio et al. **Adenoviral vector delivery of RNA-guided CRISPR/Cas9 nuclease complexes induces targeted mutagenesis in a diverse array of human cells**. Scientific reports, v. 4, p. 5105, 2014.

MALI, Prashant; ESVELT, Kevin M.; CHURCH, George M. **Cas9 as a versatile tool for engineering biology**. Nature methods, v. 10, n. 10, p. 957, 2013.

MALI, Prashant et al. **CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering**. Nature biotechnology, v. 31, n. 9, p. 833, 2013.

MARRAFFINI, Luciano A.; BARRANGOU, Rodolphe. **CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity**. Molecular cell, v. 54, n. 2, p. 234-244, 2015.

MICHELS, Luiz Fernando Nascimento. **A revolução da edição genômica com o sistema CRISPR-CAS.** Trabalho monográfico (Graduação em Biomedicina) - Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, 2017.

MOSES, Colette; KAUR, Parwinder**. Applications of CRISPR systems in respiratory health: entering a new 'red pen' era in genome editing**. Respirology, 2019.

NISHIMASU, Hiroshi et al. **Crystal structure of Staphylococcus aureus Cas9**. Cell, v. 162, n. 5, p. 1113-1126, 2015.

POLSTEIN, Lauren R; A GERSBACH, Charles. **A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation**. Nature Chemical Biology, [s.l.], v. 11, n. 3, p.198-200, 2015.

RAMAKRISHNA, Suresh et al. **Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA**. Genome research, v. 24, n. 6, p. 1020-1027, 2014.

RAMOS, António David Rufino**. CRISPR/Cas9: uma ferramenta de edição genética para investigação e novas terapias**. Trabalho monográfico (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.

RAN, F. Ann et al. ***In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9**. Nature, v. 520, n. 7546, p. 186, 2015.

REIS, Émilien Vilas Boas; OLIVEIRA, Bruno Torquato 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, 2019.

REZAEI, Hamzeh et al. **Harnessing CRISPR/Cas9 technology in cardiovascular disease**. Trends in cardiovascular medicine, 2019.

RICHTER, Corinna; CHANG, James T.; FINERAN, Peter C.. **Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR associated (Cas) systems.** Viruses, 2012.

RODRIGUES, Luan Christ et al. **O uso do sistema de edição genética CRISPR-Cas9 em humanos e espécies não humanas no brasil**. SEFIC 2017, 2017.

SÁNCHEZ-RIVERA, Francisco J.; JACKS, Tyler. **Applications of the CRISPR–Cas9 system in cancer biology**. Nature reviews cancer, v. 15, n. 7, p. 387, 2015.

SANDER, Jeffry D.; JOUNG, J. Keith. **CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting.** Nature Biotechnology, 2014.

SHUI, Bing et al. **The Rise of CRISPR/Cas for Genome Editing in Stem Cells**. Stem Cells International, v. 2016, 2016.

SONTHEIMER, Erik J.; BARRANGOU, Rodolphe. **The Bacterial Origins of the CRISPR Genome Editing Revolution**. Human Gene Therapy, New Rochelle, v. 26, n. 7, p.413-424, jul. 2015.

THAKORE, Pratiksha I. et al. **Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation.** Nature methods, v. 13, n. 2, p. 127-137, 2016.

VASCONCELOS, Maria José Vilaça de; FIGUEIREDO, José Edson Fontes. **Tecnologia CRISPR-Cas para edição genômica**. Embrapa Milho e Sorgo-Documentos (INFOTECA-E), 2015.

VERMERSCH, Eva et al. **CRISPR/CAS9 Gene-Editing Strategies in Cardiovascular Cells**. Cardiovascular research, 2019.

VIVANCO, Cintia Ribeiro et al. **CRISPR-CAS9: aspectos bioéticos e normativos do método**. Revista Brasileira de Bioética, v. 14, n. edsup, p. 76-77, 2019.

WANG, Ying et al**. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications**. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, v. 11, n. 2, p. 313-327, 2015.

YANG, D. et al.. **Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases.** J. Mol. Cell. Biol., 2014.

YANG, Weili *et al..* **CRISPR/Cas9: Implications for Modeling and Therapy of Neurodegenerative Diseases**. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2016.

ZHAO, Lan et al.. **Exploration of CRISPR/Cas9-based gene editing as therapy for osteoarthritis.** Annals of the rheumatic diseases, v. 78, n. 5, p. 676-682, 2019.

ZHOU, Yuexin et al. **High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells**. Nature, v. 509, n. 7501, p. 487, 2014.

ZURIS, John A. et al. **Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo***. Nature biotechnology, v. 33, n. 1, p. 73, 2015.