

TECNOLOGIA CRISPR-CAS9: UMA REVISÃO ACERCA DE PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS NO CÂNCER DE PULMÃO E CONSIDERAÇÕES PARA APLICAÇÃO NA TRANSGENIA HUMANA¹

André Farias Zambon², Gabriela Matte Bertoldi³, Laisa Caroline Eleutherio de Almeida⁴, Larissa dos Santos⁵, Volnei de Almeida Teixeira⁶, Vítor Antunes de Oliveira⁷

¹ Trabalho desenvolvido através do Curso de Farmácia da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ)

² Discente do Curso de Farmácia da UNIJUÍ, Técnico em Química, andre.zambon@sou.unijui.edu.br

³ Discente do Curso de Farmácia da UNIJUÍ, gabriela.bertoldi@sou.unijui.edu.br

⁴ Discente do Curso de Farmácia da UNIJUÍ, Técnica em Química, laisa.almeida@sou.unijui.edu.br

⁵ Discente do Curso de Farmácia da UNIJUÍ, Técnica em Química, larissa.ds@sou.unijui.edu.br

⁶ Docente da UNIJUÍ, Biólogo, Mestre em Ciências (Biologia Celular e Tecidual), (in memoriam)

⁷ Professor orientador, Biomédico, Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Docente da UNIJUÍ, vitor.antunes@unijui.edu.br

RESUMO

Os exponenciais avanços na área da terapia gênica e molecular vêm cada vez mais reformulando a forma de compreender e pensar sobre o material que nos faz vivos, o DNA (ácido desoxirribonucleico). A tecnologia de edição genética por complexação de CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Short Palindromic Repeats-CRISPR Associated Nucleases*) oferece destaque tendo em vista seu potencial, alta eficiência, baixo custo e rapidez para editar, corrigir e modificar o informe genético de qualquer célula. Este fato abre um leque quase infinito de possibilidades e estratégias de modificação celular para tratamento de doenças de origem genética e/ou que possam ser evitadas utilizando edição gênica. É apresentado neste trabalho a manipulação genética por meio de CRISPR-Cas9 para tratamento de câncer de pulmão e fornecido considerações acerca das perspectivas biotecnológicas para aplicação da técnica na edição do DNA humano.

INTRODUÇÃO

As bactérias são frequentemente expostas a condições que desencadeiam respostas imunes em seus organismos, como ataques por bacteriófagos. Tais acontecimentos podem gerar a transferência lateral genética, onde o elemento invasor passa seu material genético para a bactéria, mesmo que essa não seja seu descendente. Esse material pode conferir imunidade adquirida, em razão da inserção de porções deste em regiões de sequências repetitivas da molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico) bacteriano, chamadas por "CRISPR", acrônimo para "*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*" (MOJICA *et al.*, 2000).

As regiões CRISPR podem ser expressadas em fragmentos de ácido ribonucleico (RNA), que se ligam a proteínas específicas, chamadas de Cas (CRISPR associated proteins), gerando um complexo com capacidade para deteriorar o material genético exógeno. Por se tratar de um sistema de imunidade adquirida ou adaptativa, a degradação do material genético invasor apenas ocorrerá se este já tenha tido contato com a bactéria e tenha sido integrado ao seu genoma, lá manifestado em porções de RNA (ácido ribonucleico) agregadas com complexo CRISPR-Cas que destruirá o material genético invasor, impedindo sua reprodução. Posteriores estudos *in vitro* concluíram não ser apenas possível a destruição do material genético designado, mas também a edição e correção deste (HORVATH; BARRANGOU, 2010). Tal fato abriu amplo espectro de possibilidades de edição de DNA para tratamento de patologias de origem gênica ou que possam ser evitadas utilizando essa técnica, através do bloqueio, correção ou inativação do gene responsável por expressar determinada doença (CYRANOSKI, 2016).

Liderando como a causa mais mortal de câncer, o câncer de pulmão é a patologia desse tipo mais frequentemente diagnosticada e tem tido prevalência exponencial na população mundial (ACCP, 2020). Segundo a American College of Chest Physicians, é projetada uma taxa de mortalidade de 2,45 milhões de pessoas por câncer de pulmão no ano de 2030.

Nesse sentido, embora fosse extremamente viável o evitar de grande parte das mortes, visto que 80% delas é resultado do fumo de tabaco (ACCP, 2020) – faz-se necessária a busca de terapias efetivas contra a carcinogenicidade da nicotina, e, a terapia gênica por CRISPR-Cas9 traz esperança de cura efetiva contra a mortalidade do câncer de pulmão. A edição de células de defesa através da complexação pela técnica de CRISPR é inovação na biotecnologia da manipulação genética, e, mesmo recente, tem-se mostrado como promissora na cura, não só do câncer de pulmão, mas também de diversas outras patologias (SACHDEVA *et al.*, 2015).

Uma das abas abertas pelo leque da edição gênica é a manipulação do material genético de embriões humanos para propósitos eugênicos: no intuito da melhoria da raça humana. Imunidade à doenças e a escolha de características desejáveis para indivíduos editados via CRISPR são apenas algumas das aplicações que a promissora técnica oferece. Nesse sentido, princípios bioéticos devem ser estabelecidos na manipulação genética de seres humanos (CYRANOSKI, 2016; INSERM, 2021).

Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo trazer à luz informações acerca da manipulação genética por meio de CRISPR-Cas9 para as possibilidades de terapêutica de câncer de pulmão, trazendo também perspectivas biotecnológicas e éticas na transgenia humana.

METODOLOGIA

Para o alcance do objetivo proposto, optou-se pelo método de revisão literária via busca de periódicos científicos nas bases SCIELO, MEDLINE/PubMed, CINAHL e SCOPUS. Palavras-chave como “CRISPR”, “biotecnologia”, “edição genética” e “câncer de pulmão”, (bem como suas traduções para o inglês) foram as guias para a busca da literatura.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A história da CRISPR-Cas9 começou em 1987, quando um grupo de cientistas da Universidade de Osaka, liderados por Yoshizumi Ishino no Japão, estudaram a informação genética presente em uma bactéria, e reportaram a descoberta de sequências de DNA repetidas, aparentemente sem nenhuma função. Anos depois, em 1993 a equipe do pesquisador Juan Martínez Mojica da Universidade de Alicante, na Espanha, independentemente reportou a mesma descoberta, mas em genomas de organismos do domínio *archaea*, e descreveu as sequências como repetitivas e palindrômicas, que eram separadas umas das outras por meio de sequências espaçadoras, cada uma com uma sequência líder no início (MOJICA *et al.*, 2000). Mojica *et al.* chamaram essas sequências de CRISPRs, ou seja, Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas.

Quando analisadas as sequências de CRISPRs, pesquisadores perceberam a similaridade delas às sequências dos genomas de bacteriófagos e plasmídeos; além do fato delas estarem localizadas perto de genes *Cas*, que expressam um tipo de nuclease capaz de cortar e degradar DNA exógeno em sequências de sítios específicos (HORVATH; BARRANGOU, 2010). A descoberta acima concluiu que sequências de CRISPR poderiam ser parte do sistema de defesa procarionte contra invasão de agentes virais e plasmídeos. Este sistema é composto por uma proteína do tipo *Cas* ligada à um RNA vindo das sequências de CRISPRs, esta chamada de complexo CRISPR-Cas; esse sistema é ativado pela presença de DNA estranho de bacteriófagos ou plasmídeos invasores, e também é capaz de reconhecer e degradar esse DNA estranho (HORVATH; BARRANGOU, 2010).

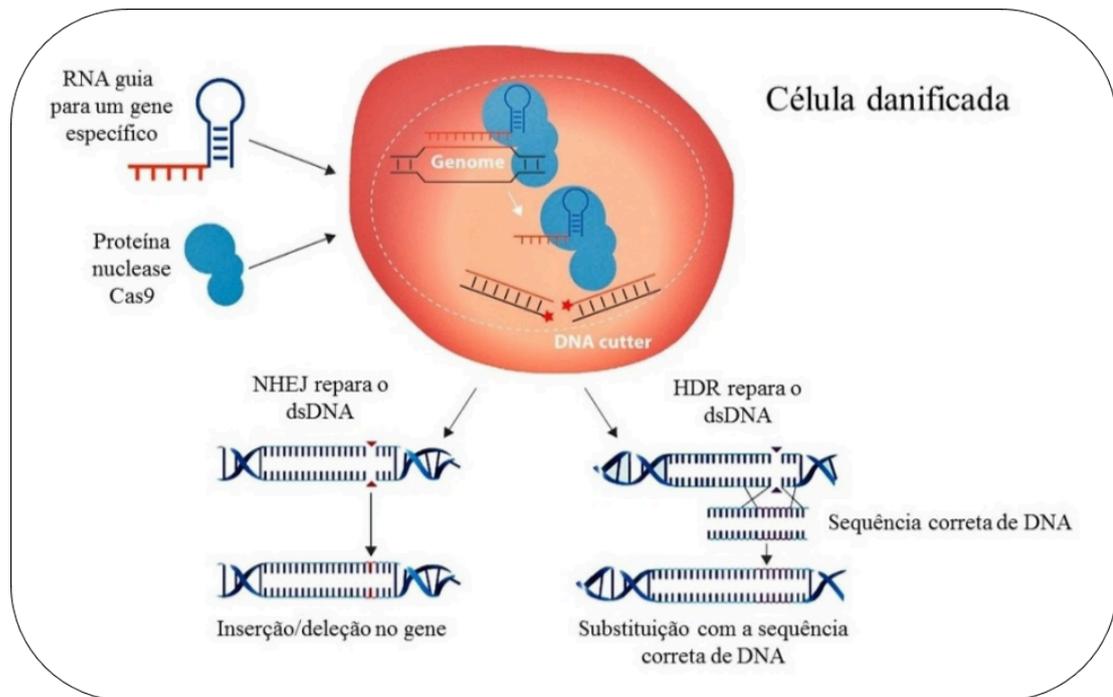
Essas observações foram posteriormente verificadas com a descoberta de que proteínas do tipo *Cas* que fizeram o complexo CRISPR-Cas não eram apenas capazes de cortarem DNA desconhecido, mas também integrar pequenos fragmentos do DNA estranho digerido no interior das sequências de CRISPR, e dessa forma, adquirir memória imunológica para futuro ataques pelo mesmo tipo de vírus. Portanto, o complexo CRISPR-Cas é na verdade um sistema de defesa procarionte baseado em imunização adquirida, que pode ser transmitido hereditariamente (HORVATH; BARRANGOU, 2010).

No ano de 2012, uma equipe de pesquisadores liderados por Jennifer Doudna, da Universidade da Califórnia, e Emmanuelle Charpentier, da Universidade de Umea, propuseram a possibilidade de modificar e implementar o complexo CRISPR-Cas para aplicá-lo como uma ferramenta biotecnológica para edição “programada” de genomas; onde uma fita de DNA poderia ser especificamente cortada *in vitro* para propósitos terapêuticos. Para seguir adiante com essa ideia, as pesquisadoras geraram um protocolo que consistia em três passos básicos. O primeiro consiste na formação e síntese de uma molécula de RNA de fita simples, chamada de “RNA guia”, que pode ligar-se à enzima *Cas9*, e que obedece às mesmas características moleculares das sequências de CRISPR, isto é, capaz de reconhecer e se juntar à uma sequência específica de DNA ou gene que se deseja editar ou corrigir. Uma vez obtido o RNA guia ligado à *Cas9*, o segundo passo é introduzir o complexo CRISPR-*Cas9 in vitro* na célula a ser tratada, e uma vez dentro, o complexo reconhecerá o exato sítio do genoma a ser cortado pela nuclease *Cas9* (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

O terceiro passo começa com a ativação dos mecanismos de reparo celulares em resposta ao corte feito pela *Cas9* endonuclease, que pode causar a perda ou adição de informação genética na região do genoma a ser editada. Isso pode levar à perda da função original do gene, resultando na inativação ou mal funcionamento da proteína que esse gene expressa, processo conhecido por NHEJ (*Non-Homologous End Joining Repair*) (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

Se o objetivo é substituir mutações cancerosas, podem ser incorporadas algumas mudanças para uma informação genética correta. Esse procedimento consiste na adição de um modelo homólogo da molécula de DNA da região a ser editada, porém, que não contém mutações carcinogênicas. Ativando o sistema de reparo por recombinação homóloga, processo chamado de Homology Directed Repair (HDR), pode ser substituído o fragmento de DNA previamente reconhecido e tratado pelo complexo CRISPR-*Cas9* (figura 1) (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

Figura 1. Edição genética por CRISPR-Cas9 usando reparo NHEJ e HDR

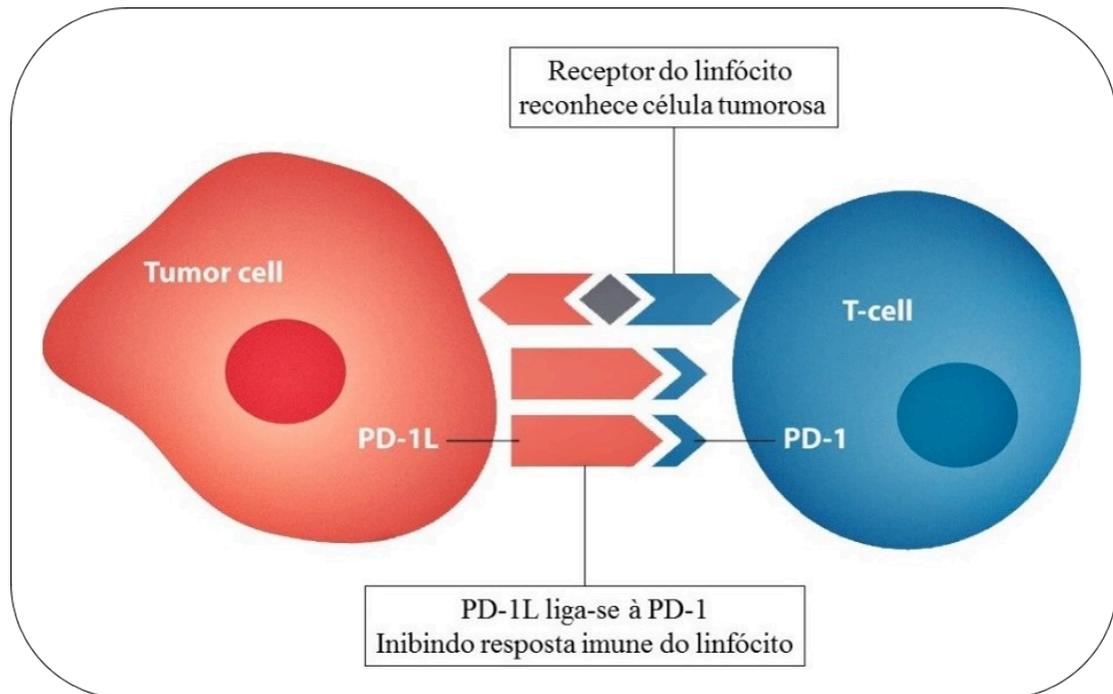


FONTE: CASTILLO, Andres (2016), (adaptado)

Publicado pela revista Nature em 2016, um artigo inovador mostrou o trabalho de pesquisadores da Universidade de Sichuan, liderados pelo Dr. Lu You, que estavam injetando linfócitos geneticamente modificados pela primeira vez em pacientes com câncer de pulmão como uma abordagem terapêutica para promover uma resposta do sistema imune no intuito do extermínio das células tumorais (CASTILLO, 2016). Na superfície da célula cancerosa há uma proteína chamada PD-L1 que se liga a outra proteína nomeada de PD-1 que fica nos linfócitos-T do sistema imune humano, bloqueando a resposta imune. Essa ligação faz parte do processo de crescimento do câncer e funciona como um escudo bioquímico que não permite a destruição do tumor (CYRANOSKI, 2016).

No objetivo de inibir esta ligação, o código genético para a proteína PD-1 foi alterado usando a técnica CRISPR-Cas9, então esperou-se que a ação do sistema imune mediada por linfócitos contra o câncer fosse mais efetiva (figura 2). Mesmo que já hajam tratamentos aprovados contra o câncer de pulmão onde a proteína PD-1 é bloqueada por imunoterapia e uso de medicamentos, é esperado que a inativação genética desta proteína seja uma estratégia terapêutica com grande eficiência e estabilidade (SACHDEVA *et al.*, 2015).

Figura 2. Células tumorais podem inibir a resposta imune corporal ligando-se a proteínas, como a PD-1 na superfície das células T. A tecnologia CRISPR-Cas9 desativou o gene para PD-1, reativando a resposta imunológica



FONTE: CASTILLO, Andres (2016), (adaptado)

Um dos objetivos do estudo publicado pela revista Nature, era avaliar se o tratamento com a tecnologia CRISPR-Cas9 é eficaz contra o câncer de pulmão, testando a segurança do teste para pacientes. No ensaio clínico, os pesquisadores trataram apenas 10 pacientes com 3 regimes de doses diferentes, que foram seguidos para monitorar qualquer tipo de efeito adverso nas células linfóides modificadas (CASTILLO, 2016). Durante a fase I do ensaio clínico desenvolvido pela equipe científica do Dr. Lu You, houveram pacientes participantes com pequenas células de câncer de pulmão com metástases, que tiveram recorrência de câncer depois da terapia inicial ou foram refratários à quimioterapia depois do tratamento (CYRANOSKI, 2016).

No procedimento, linfócitos foram extraídos do sangue do paciente para serem tratados com o sistema de edição gênica CRISPR-Cas9, no intuito de desabilitar o código genético da proteína PD-1. Células linfocíticas, inibidas para a expressão do gene para PD-1 foram testadas para sua viabilidade e linfoproliferação para exclusão de novas mutações durante o tratamento. Em seguida, os linfócitos foram transfundidos para um único paciente, este sendo monitorado enquanto era esperado que as células modificadas alcançassem o tecido tumoral e ativassem resposta

imune contra as células cancerosas (CASTILLO, 2016). O progresso foi positivo, pois o paciente transfundido com linfócitos não apresentou efeitos adversos.

Entre os riscos existentes para o tratamento com a tecnologia CRISPR-Cas9, o principal é de que pode ocorrer uma resposta auto imune excessiva. Da mesma forma, estudos complementares devem ser realizados para atestar a segurança desta técnica e a possível ocorrência de efeitos colaterais (CASTILLO, 2016).

Até agora, a tecnologia de edição genética por CRISPR-Cas9 é a melhor opção para conseguir uma cura efetiva e terapêutica para doenças de origem genética ou mediadas via expressão gênica, tais como tipos de cânceres; mas num futuro breve, o desenvolvimento dessas ferramentas aumentará o potencial de uso e a população mundial poderá se beneficiar dessas pioneiras tecnologias (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). Por essa razão, o desenvolvimento de diretrizes éticas para investigação e aplicação clínica da edição genética humana é a prioridade, no objetivo de prevenir riscos éticos com o uso destas ferramentas (TRAVIS, 2015).

Em particular, é necessário um maior estudo sobre os riscos da edição genética para propósitos eugênicos, no intuito de aprimorar a genética humana gerando desigualdades, melhorando características físicas, intelectuais ou estéticas e a transmissão hereditária destes genes. A ética precisa ser discutida pela distinção entre pesquisas de edição genética em células somáticas, germinativas ou de embriões humanos (HIRSCH; LÉVY; CHNEIWEISS, 2017).

Neste sentido, a comunidade científica realizou em dezembro de 2015 um encontro internacional chamado “Conferência Internacional Sobre Edição do Gene Humano”, a qual teve participação de universidades da ciência, engenharia e medicina dos Estados Unidos, Reino Unido e China. Neste encontro, foram discutidas precauções que devem ser tomadas para implementação da técnica CRISPR-Cas9 em pesquisa humana. Participando da conferência estavam os proponentes da técnica e cientistas que a aplicaram em embriões humanos; além disso, lá estavam cientistas e filósofos com treinamento em bioética, e advogados que possuem conhecimento sobre leis de patente. A conclusão mais importante do evento foi de que é preciso estabelecer padrões legais, éticos e de acompanhamento para pesquisa básica e pré-clínica nas expressões dos genes humanos, e o uso da técnica em células somáticas para aplicações clínicas; com algumas restrições, em células germinativas e embrionárias, pelo menos até serem obtidas informações suficientes sobre a eficiência e segurança da mesma (BROKOWSKI; ADLI, 2018).

Por fim, foi recomendado continuar a discussão e uniformização mundial de normas referentes ao uso aceitável da edição genética nas células germinativas humanas para propósitos terapêuticos. Entretanto, recentemente o comitê de ética da Agência de Pesquisa Biomédica Francesa do Instituto Nacional de Pesquisa Médica e de Saúde (INSERM) declarou sua posição sobre a

discussão supracitada e recomendou a proibição de todo e qualquer tipo de modificações genéticas nas células germinativas. Propôs também a criação de um comitê europeu de experts de diferentes áreas do conhecimento para avaliar a competência, efetividade e segurança da CRISPR-Cas9, e um grupo de acompanhamento das partes envolvidas, a fim de promover um debate sobre os aspectos sociais da edição do genoma humano (INSERM, 2021).

CONCLUSÕES

O mecanismo para edição genética pelo complexo CRISPR-Cas9 é, como demonstrado por este estudo, extremamente promissor, sendo capaz de oferecer esperança para o término de diversas doenças com origem genética. Vários estudos base para este demonstraram alto potencial no tratamento de patologias genéticas através da clivagem molecular do DNA e posterior reparação pelo método NHEJ para deleção de gene e reparação pelo mecanismo de HDR, onde é permitido corrigir e alterar-se características na expressão de um gene. Pelo seu fácil uso e alta eficácia, basicamente todas as células podem ser editadas, podendo regular-se características genéticas e epigenéticas pelo direcionamento da ação do complexo CRISPR-Cas9. A recente propagação desta inovadora tecnologia em estudos de correção genética de cânceres revela de fato o incrível poder desta técnica.

Devem ser bem estabelecidos princípios éticos-morais para a manipulação genética, principalmente em embriões humanos, pela possibilidade de produzir uma nova raça: transgênica, com características físicas, fisiológicas e intelectuais aprimoradas, selecionadas precisamente para a construção de uma espécie – em teoria – superior. Estes motivos trazem à luz uma nova era onde talvez, a raça humana torne-se imune à doenças de origem genética, tendo aumentando seu tempo e qualidade de vida.

Palavras-chave: CRISPR; Edição Genética; Oncologia; Neoplasia Pulmonar; Bioética

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HIRSCH, François; LÉVY, Yves; CHNEIWEISS, Hervé; *A European Position on Genome Editing. Nature*; 541, 30. Jan/2017.

MOJICA, Francisco J. M. *et al.*; *Biological Significance of a Family of Regularly Spaced Repeats in the Genomes of Archaea, Bacteria and Mitochondri. Molecular Microbiology*; 36(1):244-6. Abr/2000.

CYRANOSKI, David; *Chinese Scientists to Pioneer First Human CRISPR Trial. Nature*; 535:476–7. Jul/2016.

TRAVIS, John; *Breakthrough of the Year: CRISPR Makes the Cut*. **Science Magazine**. 2015. Disponível em: <goo.gl/QcJeUg>. Acesso em: 25/03/2021.

HORVATH, Philippe; BARRANGOU, Rodolphe; *CRISPR/Cas, the immune system of Bacteria and Archaea*. **Science Magazine**; 327: 167–70. Jan/2010.

SACHDEVA, Vikaas M. *et al.*; *CRISPR/Cas9: Molecular Tool for Gene Therapy to Target Genome and Epigenome in the Treatment of Lung Cancer*. **Nature**, Cancer Gene Therapy 22, 509–517. Out/2015.

BROKOWSKI, Carolyn; ADLI, Mazhar; *CRISPR Ethics: Moral Considerations for Applications of a Powerful Tool*. **Journal of Molecular Biology**; 4;431(1):88-101. Jun/2018.

MARRAFINI, Luciano A.; SONTHEIMER, Erik J.; *CRISPR Interference RNA-directed Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea*. **Natural Reviews Genetics**; 11(3): 181–90. Mar/2010.

CYRANOSKI, David; *CRISPR Gene-Editing Tested in a Person for the First Time*. **Nature**; 539: 479. Nov/2016.

CASTILLO, Andres; *Gene Editing for the Treatment of Lung Cancer (CRISPR-Cas9)*. **Colomb Med**; (Cali) 47(4): 178-80. Dez/2016.

DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle.; *Genome Editing. The New Frontier of Genome Engineering With CRISPR-Cas9*. **Science Magazine**; 28;346(6213):1258096. Nov/2014.

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); *Genome Editing – These Molecular Scissors for Precise Genome Modification*. Disponível em: <bit.ly/39girLj>. Acesso em 22/03/2021.

GEBLER, Christina *et al.*; *Inactivation of Cancer Mutations Utilizing CRISPR/Cas9*. **Journal of the National Cancer Institute**; 109(1): djw183. Ago/2016.

ISHNO, Yoshizumi *et al.*; *Nucleotide Sequence of the *lap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product*. **Journal of Bacteriology**; vol. 169, nº. 12, p. 5429–5433. Dez/1987.

American College of Chest Physicians (ACCP); *World Lung Cancer Day 2020 Fact Sheet*. Disponível em: <bit.ly/39vnPdP>. Acesso em 22/03/2021.