

---

# SISTEMA DE EDIÇÃO GÊNICA CRISPR/CAS9

## HISTÓRICO

A descrição do locus CRISPR (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*, originando o acrônimo CRISPR), ocorreu, pela primeira vez, em 1987, por Ishino e colaboradores, quando estudavam o gene *iap*, que atua na interconversão de isoenzimas da fosfatase alcalina, em *E. coli*. Naquela época, com dados insuficientes da sequência do DNA e com tecnologias não tão avançadas como as que possuímos nos dias atuais, não foi possível aos pesquisadores prever a função biológica daquelas sequências. Em 1993, o locus CRISPR foi também observado em Archaea (*Haloferax mediterranei*) e, em seguida, foi identificado no genoma de muitas outras bactérias. A conservação do mesmo locus em dois domínios da vida foi um indicativo de que, muito provavelmente, esta região possuía alguma importância. Porém, foi somente em 2005 que, de forma independente, Mojica e colaboradores, assim como Pourcel e colaboradores, reportaram que as sequências contidas nos espaçadores eram homólogas às sequências encontradas em bacteriófagos, pró-fagos e plasmídeos. Dessa maneira, demonstrou-se que organismos exógenos não eram capazes de infectar bactérias que possuíam, em seu locus CRISPR, sequências espaçadoras homólogas a

trechos do DNA destes organismos. Tais publicações deram margem para hipóteses de que a sequência CRISPR poderia estar envolvida com a imunidade bacteriana.

Estudos posteriores indicaram a ocorrência de sequências gênicas adjacentes ao locus CRISPR, as quais foram chamadas de *CRISPR-associated genes* (*Cas*). A molécula de RNA transcrita a partir do locus CRISPR funcionava por cooperação com a endonuclease Cas, produzida a partir de genes localizados próximos à região do locus, derivando daí o termo CRISPR-Cas.

No ano de 2011, o grupo da cientista Emmanuelle Charpentier (Diretora do *Max Planck Institute for Infection Biology*, Berlin, Alemanha) descobriu um componente essencial do sistema CRISPR-Cas: o RNA CRISPR transativador (*tracrRNA*), uma molécula que atua no reconhecimento do DNA invasor, em bactérias. Ao mesmo tempo, a cientista Jennifer Doudna (Universidade da Califórnia, Berkeley, EUA), trabalhava decifrando a estrutura e função biológica de ribozimas, bem como descrevendo um complexo de vigilância baseado em RNA, também em bactérias. Ao se encontrarem em um congresso, Charpentier e Doudna estabeleceram uma parceria que lhes renderia, nove anos depois, o Prêmio Nobel em Química, pelo desenvolvimento da “tesoura genômica”. Essas duas mulheres demonstraram, pela primeira vez, que o sistema CRISPR-Cas era capaz de clivar, não somente o DNA viral invasor, mas qualquer sequência de DNA, de maneira direcionada e específica. Através da Engenharia Genética, elas transformaram o locus CRISPR-Cas em uma ferramenta poderosa de edição genômica, abrindo inúmeras possibilidades, principalmente para o tratamento de doenças genéticas.

## CLASSIFICAÇÃO E MECANISMO

Três tipos diferentes do sistema CRISPR-Cas foram inicialmente descritos (Tipo I, Tipo II e Tipo III), os quais são agrupados com base na filogenia, na conservação dos genes CAS e na organização do operon. Os genes CAS codificam as proteínas Cas, um grupo altamente diversificado descrito por interagir, em sua maior parte, com ácidos nucleicos. No geral, nove tipos de proteínas Cas compõem esses sistemas. Envolvidas na adaptação, a Cas1 e a Cas2 estão presentes nos três tipos de sistemas. Em contrapartida, as proteínas Cas5, Cas6 e Cas7, as quais são compostas por diferentes subunidades, estão presentes apenas nos tipos I e III. As outras proteínas Cas são exclusivas para cada tipo de sistema.

O sistema CRISPR-Cas Tipo I tem como assinatura a proteína Cas3 que em conjunto com o complexo *Cascade* (composto por Cse1, Cse2, Cas5e, Cas6e

e Cas7) degrada a molécula de DNA invasora, através do reconhecimento do motivo PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), sequência de três nucleotídeos (5'-NGG-3') presente na molécula invasora. O sistema CRISPR-Cas Tipo II foi descrito no ano de 2012 na bactéria *Streptococcus pyogenes* e tem como assinatura a proteína Cas9, que, em conjunto com o crRNA e o tracrRNA, degrada a molécula do DNA invasor, também por meio do reconhecimento do motivo PAM. Por fim, o sistema CRISPR-Cas Tipo III parece ser o mais complexo e, diferentemente dos outros sistemas, não necessita do motivo PAM para degradar o DNA invasor. Esse sistema tem como assinatura a proteína Cas10, a qual atua em conjunto com complexos similares ao *Cascade*: Csm (Tipo III-A) ou Cmr (Tipo III-B). Enquanto os sistemas Tipo I e Tipo II tem como alvo moléculas de DNA, o sistema do Tipo III pode ter como alvo moléculas de DNA ou de RNA.

Devido à sua simplicidade, o sistema CRISPR-Cas Tipo II, foi adaptado para edição de genomas de organismos mais complexos, originando o sistema de edição genômica conhecido como CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9*). No sistema natural, pequenos fragmentos do DNA invasor são incorporados ao DNA genômico da bactéria, na forma de protoespaçadores entre sequências repetidas (repetições CRISPR), formando os *clusters* que caracterizam as regiões CRISPR. O conjunto de protoespaçadores é transcrito em um único RNA (pré-crRNA), o qual é processado pela enzima RNase III originando os CRISPR RNAs (crRNAs). Essas moléculas associam-se com um segundo tipo de RNA, o *transactivating CRISPR RNA* (tracrRNA), formando um híbrido crRNA:tracrRNA, o qual interage com a endonuclease Cas9. Esse complexo ternário tem como alvo sequências específicas do DNA invasor, as quais são complementares à sequência de 20 nucleotídeos (nt) presentes na extremidade 5' do crRNA, localizadas à jusante (*upstream*) de um motivo PAM. Após o pareamento, a Cas9 cliva as duas fitas do material genético invasor (Figura 2A), através de dois domínios catalíticos presentes em sua estrutura: o domínio HNH, responsável por clivar a fita complementar à sequência do crRNA e o domínio RuvC, responsável por clivar a fita oposta (não complementar).

O sistema adaptado é composto apenas por dois componentes: a endonuclease Cas9 e um RNA guia (gRNA), formado a partir da fusão do crRNA e do tracrRNA. Esse gRNA possui em sua extremidade 5' uma sequência de aproximadamente 20 nt, responsável por guiar a Cas9 até a sequência complementar de

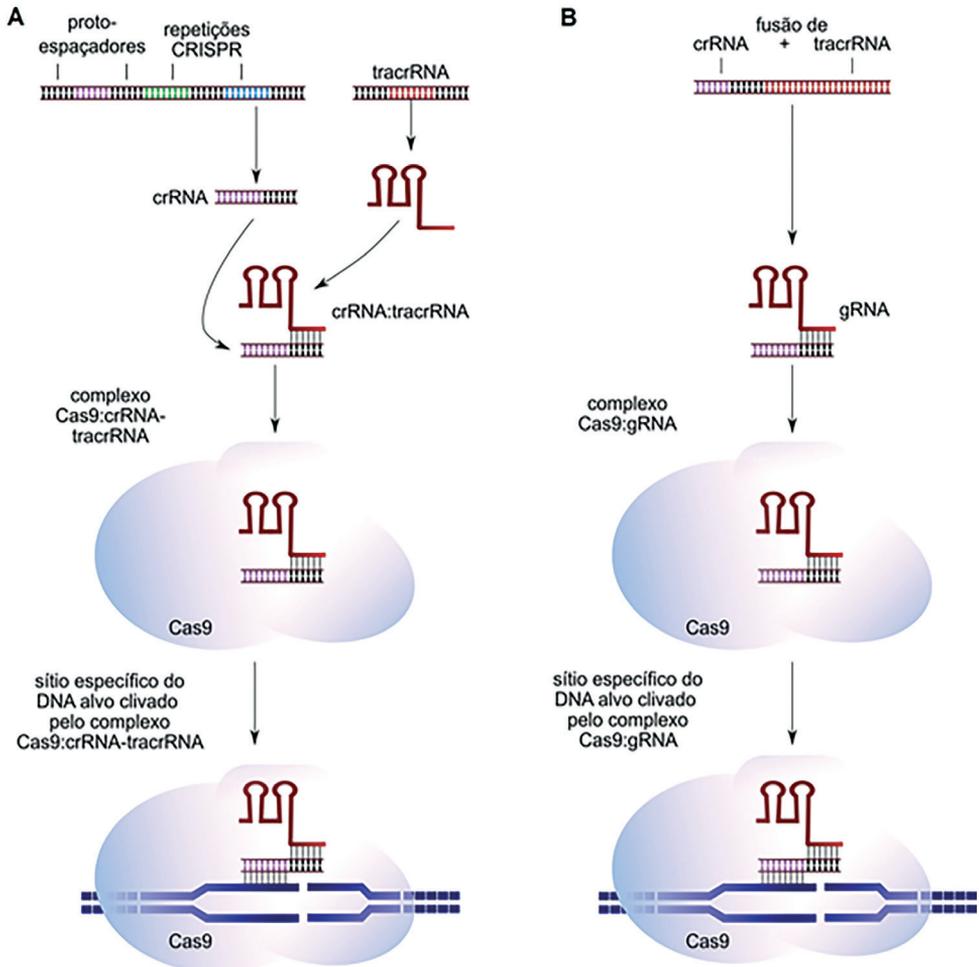
20 nt presente no DNA alvo. A interação do complexo com o DNA alvo só acontece na presença de um motivo PAM adjacente, o qual fica localizado na fita de DNA alvo não complementar (Figura 2B). Isso torna essa ferramenta extremamente interessante, visto que o gRNA é “programável” e pode ser desenhado para se alinhar a qualquer região genômica de interesse.

A clivagem da dupla fita do DNA alvo, realizada pela Cas9, gera extremidades abruptas que necessitam ser reparadas pela célula, visto que este dano pode levar a mesma à apoptose ou à senescência. Dois mecanismos de reparo distintos podem ser ativados para corrigir o dano: I) reparo por recombinação não homóloga através da via de junção de extremidades não homólogas (NHEJ em inglês, *non-homologous end joining*) ou II) reparo por recombinação homóloga através da via de reparo direcionado por homologia (HDR em inglês, *homology directed repair*).

Na maior parte das vezes, a clivagem da dupla fita do DNA alvo gera extremidades que não possuem grau de homologia. Nessas ocasiões, a via de reparo NHEJ é responsável por unir novamente as duas pontas do DNA, através de mecanismos independentes de homologia. No entanto, esse reparo é intrinsicamente propenso a erros, culminando na geração de *indels* no sítio onde ocorreu a clivagem ou próximo a ele. *Indel* é um tipo de mutação que pode ocasionar a inserção ou deleção de um ou poucos nucleotídeos e, conseqüentemente, alterar a fase de leitura do gene em estudo. Essa mudança quase sempre resulta em códons de parada prematuros, os quais interferem diretamente na estrutura ou função do produto final do gene, levando a formação de moléculas funcionais truncadas. O resultado final é a inativação (nocauteamento) do gene alvo.

No entanto, em algumas ocasiões a clivagem pode gerar extremidades que apresentam homologia entre si ou com alguma molécula de DNA doador exógeno (deve possuir homologia com ambas as extremidades do DNA resultantes da clivagem). A via de reparo HDR é responsável por corrigir o dano nessas situações. Para que essa via seja desencadeada, a endonuclease Cas9 e o gRNA são introduzidos na célula juntamente com uma molécula de DNA doador exógeno. Essa via é extremamente eficiente e culmina no perfeito reparo da região ou em modificações genéticas precisas, como a incorporação de mutações pontuais (substituição alélica) ou a inserção de sequência curtas (*knock-in*).

Figura 2: Sistema natural e modificado de CRISPR/Cas.



(A) O sistema CRISPR/Cas natural incorpora seqüências de DNA exógeno dentro dos CRISPR *arrays*, os quais geram crRNAs que carregam as regiões *protospacer* que são complementares às regiões específicas presentes no DNA invasor. Os crRNAs se ligam, por complementaridade de bases, aos tracrRNAs (que também são codificados pelos sistemas CRISPR) e estes RNAs híbridos podem se associar com a endonuclease Cas9. O complexo crRNA-tracrRNA:Cas9 reconhece e cliva DNAs exógenos, que são posteriormente eliminados por degradação. (B) O sistema CRISPR/Cas adaptado para a pesquisa em organismos mais complexos, requer a fusão entre o crRNA e o tracrRNA em apenas uma molécula denominada RNA guia (gRNA). Uma vez gerado, o gRNA é complexado à Cas9 e direciona a clivagem do DNA-alvo que for complementar à região 5' presente no gRNA à jusante (*upstream*) em relação à seqüência de DNA PAM (5'-NGG-3'). A quebra de dupla fita do DNA dispara as vias de reparo da célula através dos mecanismos de recombinação que podem ser não homólogos ou homólogos.

## FORMAS ADAPTADAS DA ENZIMA CAS9

A Cas9 tem sido amplamente conhecida por estar associada ao locus CRISPR e pela sua capacidade de clivar fitas de DNA. A proteína Cas9 existente no sistema CRISPR do tipo II, apresenta dois domínios catalíticos responsáveis por sua atividade de endonuclease, a saber: os domínios RuvC e HNH. As formas adaptadas das Cas9 são proteínas que sofreram mutações pontuais (D10A e H840A) nesses domínios catalíticos, de modo a gerar proteínas incapazes de clivar a dupla fita do DNA, porém sem alterações na sua capacidade de ligação ao sítio alvo. Essas proteínas mutantes são chamadas de *dead Cas9* ou, simplesmente, dCas9. Dessa maneira, é possível acoplar à dCas9 moléculas que atuarão na modulação gênica, inibindo (CRISPRi) ou ativando (CRISPRa) a transcrição do gene de interesse.

Para a utilização do CRISPRi, é necessário que haja o acoplamento da dCas9 com domínios repressores da transcrição, dos quais o domínio KRAB (*Krueppel-associated box*) é o principal representante, por ser o primeiro repressor transcricional utilizado para alterações epigenômicas precisas. O domínio KRAB age como repressor da transcrição, pois quando levado pela dCas9 até a região regulatória alvo, recruta moléculas que atuam no remodelamento da cromatina, inserindo marcas epigenéticas, como metilação e desacetilação que causarão o bloqueio transitório da transcrição. Outras moléculas repressoras podem ser fusionadas à dCas9, como a LSD1 (*Lysine-specific methylase 1*) e SID (*SIN3-interaction domain*).

Quando o intuito é ativar a transcrição gênica, utilizam-se juntamente com a Cas9, domínios efetores ou ativadores, como VP64, VPR, p65 ou Rta. Nessa abordagem, a região alvo pode ser acetilada ou os genes podem sofrer uma ativação direta pelo recrutamento de fatores de transcrição. Em CRISPRa, ainda é possível maximizar a técnica ao incorporar sistemas capazes de recrutar múltiplos domínios efetores para a região alvo. Exemplos dessas tecnologias são *SunTag*, um arranjo de peptídeos que permite o recrutamento de domínios efetores através de fragmentos variáveis de anticorpos; *Scaffold*, que consiste em uma sequência guia modificada para conter a sequência de um aptâmero, o qual, por sua vez, atrai uma proteína aptâmero-específica fusionada a ativadores transcricionais; e *SAM*, junção da tecnologia *Scaffold* com a dCas9 fusionada a ativadores transcricionais.

## APLICAÇÕES DO SISTEMA CRISPR/CAS9

Evidentemente, a ferramenta de edição gênica CRISPR/Cas9 está possibilitando grandes progressos em diversas áreas do conhecimento. Sua capacidade de promover eficientemente modificações genéticas possibilita diversos estudos sobre rearranjos genômicos e suas relações com a progressão de doenças, como o câncer; a triagem de drogas terapêuticas e de genes envolvidos em doenças; a criação de organismos-modelo com características específicas para diversos tipos de estudo; além da possibilidade de melhorar organismos economicamente relevantes, como plantas alimentícias e fungos, para diversos fins. Neste tópico, detalharemos algumas dessas possibilidades.

### Na Produção de Alimentos:

Melhoramento genético já é um conceito amplamente aceito, sendo aplicado na Agricultura, uma vez que torna possível obter aumento do rendimento (produtividade por planta), melhora na qualidade dos alimentos e resistência das plantas ao estresse biótico ou abiótico, sendo todos estes fatores dependentes da atividade complexa de diversos genes envolvidos em características que impactam no desempenho do produto final. A utilização do sistema CRISPR/Cas9 na Agricultura acelera e torna esse melhoramento ainda mais específico. Uma das vantagens em se utilizar essa tecnologia para gerar edição no genoma de plantas é a possibilidade de se obter um produto livre de transgene. Para evitar problemas regulatórios e ecológicos e buscar a aceitação pública é necessário que não haja vestígios de transgene no produto final, o que pode ser alcançado através da expressão transitória do DNA ou RNA que codifica a maquinaria do sistema.

A primeira modificação de plantas com a aplicação do sistema CRISPR/Cas9 ocorreu em 2013, quando o grupo da pesquisadora Caxia Gao, do Instituto de Genética e Biologia da Academia Chinesa de Ciência, conseguiu modificar quatro genes de um cultivar de arroz e um gene no cultivar de trigo. Estudos agrícolas, utilizando Engenharia Genômica, têm buscado identificar *loci* gênicos responsáveis por características que aumentem a qualidade nutricional, resistência a herbicidas e ao estresse biótico e abiótico. Assim, por exemplo, a edição dos genes GS3, Gn1a, GW2, TGW5 e OsRAV2, através da tecnologia de CRISPR/Cas9, levou ao aumento do número, tamanho e peso de grãos de arroz e conferiu tolerância ao estresse salino; a edição do gene ALS1 e GBSS, tornou batatas mais resistentes a herbicidas e conferiu maior teor de amilopectina; a edição do gene CsLOB1, fez com que laranjeiras se tornassem resistentes a bactérias causadoras de úlceras.

Infecção de grandes lavouras por vírus pode ser catastrófica, além de gerar significativo impacto econômico. Pensando nisso, pesquisadores utilizam o sistema CRISPR/Cas9 para desenvolver imunidade nas plantas contra vários germinivírus, como o Vírus da Folha Amarela do Tomate (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus* – TYLCV), Vírus da Beterraba Encaracolada (*Beet Curly Top Virus* – BCTV) e o Vírus do Mosaico do Nabo (*Turnip Mosaic Virus* – TuMV).

Além de seu uso no melhoramento vegetal, a edição gênica por CRISPR/Cas9 pode ser utilizada como estratégia de defesa na produção de bioprodutos de interesse comercial, como enzimas e laticínios. As plantas industriais que utilizam bactérias para gerar o produto de interesse são propensas ao ataque por bacteriófagos, sendo assim, a utilização do sistema CRISPR/Cas9 para gerar cepas bacterianas resistentes a estes fagos é uma aplicação bastante promissora desta tecnologia.

Levando em consideração as mudanças climáticas pelas quais o Mundo está passando, problemas de desertificação e salinização de áreas, aumento da população mundial, com expectativa de chegar aos 8,3 milhões em 2030, é premente a necessidade de utilizar novas tecnologias para garantir segurança alimentar para as próximas gerações, sendo a edição gênica, via CRISPR/Cas9, sem dúvida alguma, uma grande aliada da Humanidade neste aspecto.

### No Combate a Agentes Causadores de Doenças:

Um nicho promissor para a utilização da tecnologia de edição gênica é a manipulação genética de mosquitos transmissores de doenças.

Pesquisas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) buscam identificar e modificar genes envolvidos na resistência do mosquito *Aedes aegypti* à infecção pelo vírus da dengue. Realizando edições gênicas em embriões do mosquito, é possível estabelecer uma população de *Aedes aegypti* resistente ao vírus que, conseqüentemente, será impossibilitada de infectar seres humanos. CRISPR/Cas9 está sendo utilizado, ainda, em progenitores neurais humanos para identificar genes que, quando mutados, conferem resistência à morte celular induzida pelo Zika vírus.

O papiloma vírus humano (HPV) possui duas proteínas (E6 e E7), que são responsáveis por conferir o caráter maligno (canceroso) ao tecido infectado. Pesquisadores induziram mutação nos oncogenes que codificam essas proteínas, tornando-as inativas e promovendo efeitos antitumorais de genes supressores tumorais, como os p53 e pRb. Da mesma maneira, estudos utilizando CRISPR/Cas9, têm inibido a replicação do vírus da hepatite B em linhagem celular humana.

## Na Terapia Gênica:

Uma aplicação do sistema CRISPR/Cas9, na qual é impossível não pensar, é a edição do genoma de organismos eucariotos, visando terapias que possam trazer melhoras significativas ou até mesmo a cura de determinadas doenças. A comunidade científica tem se debruçado sobre tal possibilidade. Trabalhos de Gao e colaboradores descreveram, em 2017, a edição do genoma de ratos que possuem um alelo dominante do gene *Tmc1* (*Transmembrane Channel-like Gene Family 1*), chamados de linhagem *Beethoven* (*Bth*), uma vez que este gene está associado à surdez. Os resultados foram animadores, pois houve uma melhora na taxa de sobrevivência das células ciliadas auditivas (células transdutoras das vibrações acústicas em sinais elétricos nervosos e que são afetadas por mutações no gene *Tmc1*). Além disso, houve uma melhora no reflexo comportamental acústico em animais que foram tratados para a eliminação funcional do alvo, apontando que tal método é passível de ser utilizado no tratamento da perda de audição autossômica dominante.

Outro exemplo que pode ser citado é a edição, via CRISPR/Cas9, do oncogene *HER2* (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*). Esse oncogene, que nomeia um dos subtipos de câncer de mama, quando superexpresso pelas células tem a capacidade de gerar neoplasia mamária. Ao realizarem a edição, os autores verificaram diminuição do crescimento da linhagem celular que apresentava amplificação desse oncogene.

Estudos explorando letalidade sintética, demonstraram que edições concomitantes, por CRISPR/Cas9, dos genes *SETDB1* (*SET Domain Bifurcated 1*), envolvido na regulação epigenética de expressão, e do gene *CHD4* (*Chromodomain Helicase DNA-Binding Protein 4*), envolvido no reparo de danos ao DNA, podem tornar células tumorais mais sensíveis à ação de quimioterápicos genotóxicos. Um outro exemplo prático do uso do CRISPR para terapia gênica em células somáticas é a manipulação de células do sistema imunológico de pacientes com câncer, com o objetivo de que as células de defesa reconheçam as células cancerígenas que costumam passar despercebidas pelo sistema de defesa. Essa aplicação tem se mostrado segura e com resultados cada vez mais promissores. Além desses exemplos, diversos tipos de doenças já podem ser tratadas com terapia gênica utilizando-se CRISPR.

Alguns cientistas estão desbravando um território repleto de questões éticas e regulamentares que é o estudo da edição para corrigir genes defeituosos em embriões humanos. Ma e colaboradores realizaram a edição do gene *MYBPC3* (*Myosin Binding Protein C3*) em embriões humanos. Existe uma condição cardiopatológica

conhecida como cardiomiopatia hipertrófica que pode ser causada pela mutação em vários genes, incluindo o gene MYBPC3, que codifica uma proteína de mesmo nome, sendo importante para manter a estrutura do músculo cardíaco, bem como para regular a contração e relaxamento do mesmo. Ao realizar a edição desse gene, buscando corrigi-lo, os autores verificaram que, quando os componentes da edição foram injetados em uma fase e de uma maneira específica no oócito, 72,4% dos embriões apresentaram apenas a cópia saudável do gene MYBPC3. É importante ressaltar que, nesse caso, os embriões não foram implantados.

No entanto, é inegável a necessidade de discussões e regulamentações claras a respeito das implicações éticas na utilização da ferramenta CRISPR/Cas9. E isso é assunto para nosso próximo tópico.

### Implicações éticas da tecnologia de CRISPR/Cas9

O potencial para se realizar Engenharia Genética, Biotecnologia e pesquisas básicas cresceu exponencialmente com o rápido avanço das técnicas de edição de genomas. Por isso, ao utilizar essas ferramentas inovadoras devemos nos questionar sempre sobre as implicações éticas e as consequências dos produtos gerados e das manipulações genéticas que estão sendo propostas, além de outras questões que dependerão dos objetivos que movem cada estudo ou o desenvolvimento de uma nova tecnologia.

O sistema CRISPR é uma tecnologia de edição genômica extremamente simples e barata, uma vez que depende apenas da expressão da enzima Cas9 e do gRNA nas células ou organismo alvo. Desde que o CRISPR passou a ser amplamente utilizado, há cerca de oito anos, tendo resultado, inclusive, na premiação de duas pesquisadoras como o Nobel de Medicina, como citado na Introdução deste trabalho, tanto as revistas científicas como os órgãos internacionais debatem questões éticas que determinam limites para a aplicação desta tecnologia.

Dentre a ampla gama de possibilidades para a manipulação de genomas, questões éticas relacionadas à manipulação genética de embriões humanos é a mais delicada. A descoberta do sistema CRISPR fez ressurgir a onda de debates dada a precisão e facilidade com que esta técnica pode ser empregada. Segundo o Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano nos Estados Unidos (NHI), em 2014, 40 países desencorajaram ou baniram completamente pesquisas que envolvem edição genética de células germinativas humanas. A fim de regular tais tipos de pesquisa, criou-se em 2015 o *International Summit on Human Gene Editing*. No Brasil, a Lei de Biossegurança 11.105, de 2005, no artigo sexto, proíbe Engenharia Genética em células germinativas, zigotos ou

embriões humanos. Em geral, especialistas da área concordam que a edição do genoma humano para fins reprodutivos não deve ser utilizada, uma vez que os riscos não são justificados pelo potencial benefício que a técnica pode trazer.

No entanto, há um grande interesse no uso da tecnologia de CRISPR/Cas9 para fins terapêuticos que não envolvem a manipulação gênica de células germinativas. Mas, ainda assim, em 2018, um acontecimento estremeceu a comunidade científica, quando o cientista chinês He Jiankui, admitiu ter criado os primeiros bebês geneticamente modificados da história. Segundo o pesquisador, ele editou o gene CCR5 (*C-C Chemokine Receptor 5*), que codifica receptores utilizados pelo HIV para infectar as células e isso tornaria as gêmeas, Lulu e Nana (nomes fictícios), resistentes à infecção pelo vírus. Estudos que também realizaram a mutação do gene Ccr5, porém em ratos, demonstraram que os animais modificados se tornaram cognitivamente mais habilidosos, principalmente em se adaptar e em memorizar. Os resultados em ratos foram benéficos, mas não se pode garantir que em Lulu e Nana, e em sua descendência, eles também serão. Vale lembrar, ainda, que o cientista responsável por essa façanha foi condenado a três anos de prisão.

Assim sendo, surge cada vez mais a necessidade do aprofundamento da técnica, no que diz respeito à segurança, reprodutibilidade, efeitos a longo prazo e, principalmente, discussões sobre o estabelecimento de limites em sua utilização.

Após esta breve Introdução, a seguir será descrita, de forma detalhada, o passo a passo de como realizar uma edição gênica confiável utilizando o sistema CRISPR/Cas9.

