

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso Biomedicina

Amanda Miyuki Hidifira

**UTILIZAÇÃO DOS MECANISMOS ENDÓGENOS DE REPARO
GENÉTICO PELO SISTEMA CRISPR-Cas9**

São Paulo

2019

Amanda Miyuki Hidifira

**UTILIZAÇÃO DOS MECANISMOS ENDÓGENOS DE REPARO
GENÉTICO PELO SISTEMA CRISPR-Cas9**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Biomedicina do Centro
Universitário São Camilo, orientado pela Profa.
Dra., Renata Cristina Pardos Baida Andreoli,
como requisito parcial para a obtenção do título
em Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Hidifira, Amanda Miyuki

Utilização dos mecanismos endógenos e reparo genético pelo sistema CRISPR-Cas9 / Amanda Miyuki Hidifira. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2019.
49 p.

Orientação de Renata Cristina Pardos Baida Andreoli.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2019.

1. Edição de genes 2. Reparo do DNA 3. Sistemas CRISPR-Cas 4. Terapia genética I. Andreoli, Renata Cristina Pardos Baida II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 575.1

Amanda Miyuki Hidifira

**UTILIZAÇÃO DOS MECANISMOS ENDÓGENOS DE REPARO
GENÉTICO PELO SISTEMA CRISPR-Cas9**

São Paulo, 23 de outubro de 2019.



Professora Doutora Renata Cristina Pardos Baida Andreoli

Professor Doutor Fábio Mitsuo Lima

HIDIFIRA, A. M UTILIZAÇÃO DOS MECANISMOS ENDÓGENOS DE REPARO GENÉTICO PELO SISTEMACRISPR-Cas9. 49.Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina) Centro Universitário São Camilo / CUSC. São Paulo. 2019.

Do momento em que estrutura do DNA foi proposta por Watson e Crick a ideia de que haveria a possibilidade de manusear o DNA, realizando modificações em locais específicos foi dada e assim pesquisas foram iniciadas. As bactérias, possuem um certo tipo de maquinaria responsável pelo processo de reparo do DNA e isso parte de um dos mecanismos do seu sistema imune adaptativo, responsável pela memória imunológica contra certos tipos de infecções virais. Nesse sistema encontrado dentro dos organismos procariotos, encontra-se o CRISPR-Cas9, que basicamente são regiões do genoma onde se encontram pequenas repetições interespaçadas do genoma bacteriano intercaladas com o genoma viral. Partindo dessa descoberta, o uso do sistema CRISPR-Cas9 foi colocado em prática como ferramenta de edição gênica, pois por meio dela é capaz de se criar uma quebra na dupla fita de DNA, induzindo as vias de reparo endógeno do DNA, conduzidas tanto por homologia quanto por não homologia. Essas vias são responsáveis, então, por realizar certos reparos ao longo do DNA que podem acarretar em correções de certas doenças ou resultar em mutações indesejáveis.

Palavras-Chave: Edição de genes. Reparo do DNA. Sistemas CRISPR-Cas. Terapia genética

HIDIFIRA, A. M USE OF ENDOGENOUS MECHANISMS OF GENETIC REPAIR BY THE CRISPR-CAS9 SYSTEM. Dissertation (Term paper in Biomedicine) Centro Universitário São Camilo / CUSC.

From the moment that DNA structure was proposed by Watson and Crick the idea that there would be the possibility of manipulating the DNA, making modifications in its specific locations was given and so searches were initiated. Bacteria have a certain type of machinery responsible for the DNA repair process and this is part of one of the mechanisms of their adaptive immune system responsible for immune memory against certain types of viral infections. In this system found within the prokaryotic organisms, we find CRISPR-Cas9, which are basically regions of the genome where small interspaces of the bacterial genome are interspersed with the viral genome. Based on this finding, the use of the CRISPR-Cas9 system has been put into practice as a genomic editing tool, because it is able to create a break in the DNA double strand, inducing endogenous DNA repair pathways, conducted both by homology as by non-homology. These pathways are then responsible for performing certain DNA repairs that may result in corrections of certain diseases or result in undesirable mutations.

Keywords: Genetic Editing. CRISPR- Cas9. Repair pathway. Gene therapy

Lista de Figuras

Figura 1- Modelo de Dupla Hélice do DNA	2
Figura 2- Prêmio Nobel de Química 2015.....	5
Figura 3 - Construção da Molécula de DNA Recombinante.....	13
Figura 4- Nucleases Programáveis.....	15
Figura 5- Maquinaria do Sistema CRISPR-Cas9	17
Figura 6- Vias de Reparo do DNA mediadas pela Cas9	20
Figura 7- Classificação do Sistema CRISPR-Cas9.....	22
Figura 8 - Funcionamento do Sistema CRISPR-Cas9.....	23
Figura 9 - Vias de Reparo usada pela CRISPR-Cas9	24
Figura 10- Proteínas presentes nas vias de reparo do DNA.....	25
Figura 11- Mutações Geradas pelas vias de reparo.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O surgimento da Biologia Molecular.....	1
1.2 Mecanismo de Reparo do DNA.....	4
2. OBJETIVO	9
2.1 Objetivo Geral	9
2.2 Objetivos Específicos:.....	9
3. METODOLOGIA	10
4. DESENVOLVIMENTO	11
4.1 Fundamentos da Edição Gênica.....	11
4.2 Início da Terapia Gênica – DNA Recombinante.....	12
4.3 Nucleases Programáveis: CRISPR-Cas9.....	15
4.4 Uso das Vias de Reparo do DNA pela CRISPR-Cas9.....	23
4.5 Aplicações da CRISPR-Cas9	27
4.6 Questões Éticas.....	29
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
6. REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

1.1 O surgimento da Biologia Molecular

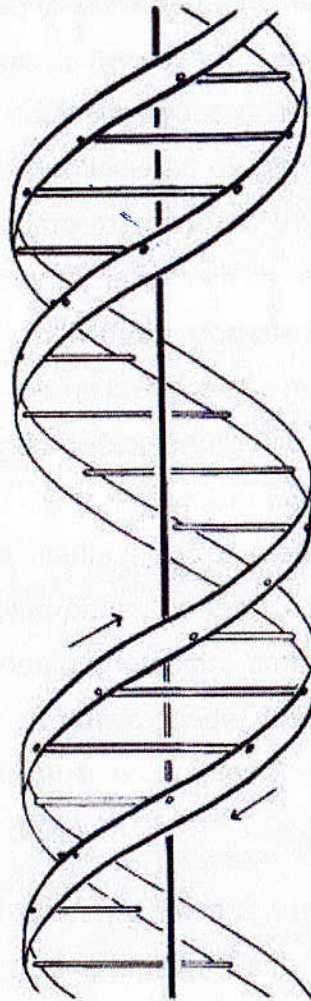
"[...] A vida depende da capacidade das células de armazenar, recuperar e traduzir as instruções genéticas necessárias para manter o organismo vivo [...]" (ALBERTS, 2017 p.173).

Essa frase, contida no livro *Biologia Molecular da Célula*, nos dá uma breve noção de quão importantes são as características genéticas presentes em nossas células. São características hereditárias, portanto, suas informações são passadas de uma célula às suas células-filhas e de uma geração a outra. Todos os organismos são constituídos por estruturas denominadas células, que representam a menor unidade de vida e que contém as principais características morfológicas e fisiológicas dos organismos vivos (ZAHA, 2014; ALBERTS, 2017).

O termo "biologia molecular" foi proposto por Warren Weaver, da Fundação Rockefeller, em um relatório publicado na revista *Science*, em 1938. Nessa publicação, Weaver destaca a importância no conhecimento das estruturas das moléculas para, assim, compreender os fenômenos biológicos. Aos poucos, esse termo foi sendo relacionado a pesquisas relacionadas aos genes (SCHEID, 2005).

O modelo de dupla hélice (Figura 1), atualmente utilizado para descrever a estrutura do DNA, é atribuído a James Watson e Francis Crick, e foi divulgado no artigo *Molecular Structure of Nucleic Acids* na revista *Nature*, em 1953 (SCHEID; FERRARI; DELIZOICOV, 2005).

Figura 1- Modelo de Dupla Hélice do DNA



Modelo da dupla hélice proposto por Watson e Crick.

Fonte: (WATSON; CRICK, 1953)

Um método importante para a interpretação do genoma é a pesquisa das sequências de DNA semelhantes em diferentes espécies como por exemplo, entre humanos e camundongos, partindo-se do princípio de que se uma sequência de DNA possui uma função, será conservada gerando regiões similares. Todos os mamíferos possuem entre 70.000 e 100.000 genes presentes ao longo de seus cromossomos, de forma linear, em cerca de 3,2 bilhões de pares de nucleotídeos. O mapeamento do gene foi realizado em humanos e em cerca de outras 30 espécies de mamíferos, com dois objetivos gerais: (1) possuir em recurso para localizar determinadas características genéticas hereditárias, comportamentos e fenótipo e (2) possuir um

modelo de interpretação de padrões genéticos que podem estar relacionados à evolução. A realização da pesquisa das sequências do DNA envolvem o mapeamento genético e para ser realizado é necessário uma integração de 3 categorias de marcadores: (1) o do tipo I codificam genes que por meio da comparação entre as sequências de DNA realiza a identificação de genes ortologs, (2) os marcadores do tipo II, também conhecidos como marcadores VNTR (VNTR – “*variable number of tandem repeats*”) são altamente informativos em avaliações de populações e pesquisas forenses, assim, indivíduos podem ser diferenciados por meio das sequências VNTR, baseando-se na ideia de que mutações podem alterar a sequência de DNA de um indivíduo, sendo necessário o uso de enzimas de restrição, de modo perdem a sua capacidade de clivar regiões do DNA em regiões ainda susceptíveis a clivagem no DNA de outros indivíduos, (3) os marcadores do tipo III são do tipo SNP (SNP- “*single nucleotide polymorphism*”) e tem como base modificações elementares nas bases nitrogenadas (adenina, citosina, timina e guanina), são abundantes no genoma Assim, o estudo evolutivo pode levar a descoberta de adaptações moleculares, que permitem aos organismos de adquirir novas características (OBRIEN,1999; CAETANO, 2009).

Uma ferramenta muito bem-sucedida é a modelagem por homologia, também conhecida como modelagem comparativa. Essa abordagem baseia-se em padrões gerais, em nível molecular: (1) a homologia entre as sequências de aminoácidos, que implica semelhança estrutural e funcional, (2) proteínas homologas, que possuem regiões internas conservadas e (3) diferenças estruturais externas, que se ligam a estruturas secundárias (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003).

O genoma pode ser dividido em duas regiões: (1) regiões conservadas e (2) regiões pouco conservadas. As *regiões conservadas*, por definição, são aquelas responsáveis pelos genes codificantes de proteínas e constituem aproximadamente 5% do genoma total. Também são aquelas nas quais as mutações são capazes de prejudicar funções nos indivíduos, podendo assim, em casos extremos, resultar na provável eliminação da espécie. Essa “evolução” do genoma depende de acidentes e sobrevivência não aleatória, podendo ocorrer devido a falhas nos mecanismos que copiam e mantêm o nosso DNA. Erros durante a fase de replicação do DNA, na recombinação ou no próprio reparo, podem causar alterações locais chamadas

mutações pontuais, ou alterações em larga escala, como duplicação, deleção, inversão e translocações do cromossomo. (GREGORY, 2005; ALBERTS, 2017).

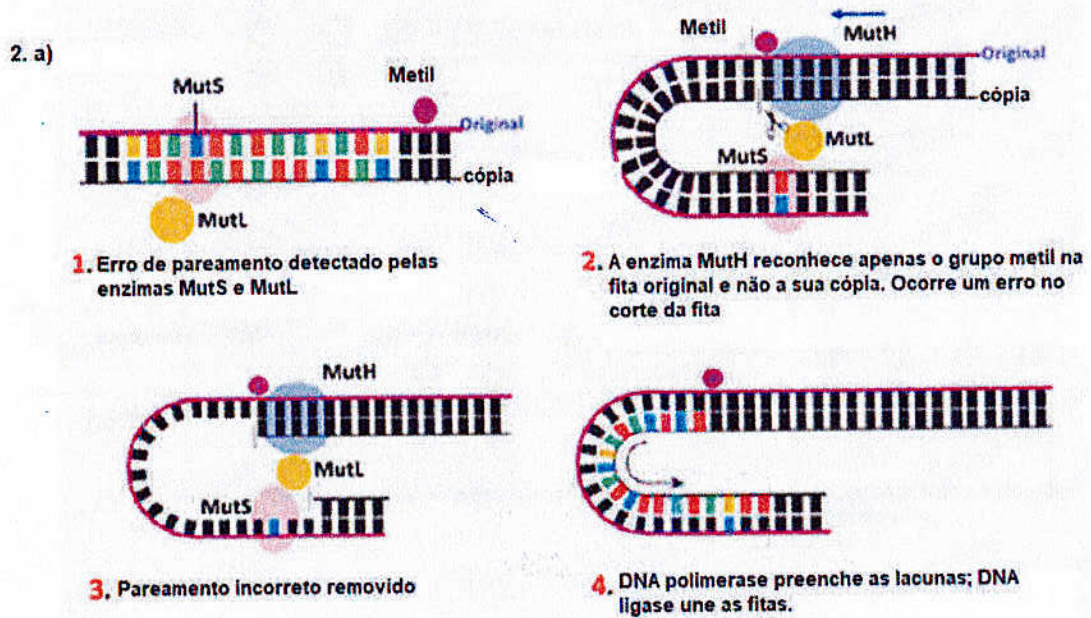
As lesões mais comuns no DNA são as de base, açúcar e danos em fita única de DNA, resultantes de oxidação, alquilação, desaminação e hidrólise. Ao mesmo tempo, as células do organismo estão constantemente sob estresse exógeno (radiação ultravioleta e ionizante e produtos químicos) ou endógeno (espécies reativas de oxigênio e nucleases). Esses agentes podem modificar a estrutura do DNA de forma que ocorram mutações durante a transcrição do RNA e replicação do DNA, alterando a função das proteínas regulatórias do DNA e levando à morte celular. As lesões podem ocorrer em quase todas as regiões da estrutura do DNA e seu alcance pode variar desde lesões menores a maiores, lesões na fita simples ou na fita dupla, que podem ser na maior parte, letais. (BAUER, CORBETT e DOETSCH, 2015).

1.2 Mecanismo de Reparo do DNA

No ano de 2015, o Prêmio Nobel de Química foi outorgado aos cientistas Tomas Lindahl, Paul Modrich e Aziz Sancar pela relevância de seus estudos sobre os mecanismos de reparo do DNA. Essas vias apresentam um alto grau de conservação, o que sugere que não foram substituídas durante o processo de evolução, mas sim, mantidas e ampliadas. Na ausência de alguns desses mecanismos, o colapso da célula seria inevitável, assim, a presença de alterações nos mecanismos de reparo de DNA está diretamente ligada ao aparecimento de tumores. Por outro lado, sabe-se que, ao mesmo tempo, células tumorais fazem o uso desses mecanismos de reparo para a sua sobrevivência (MENCK, 2015).

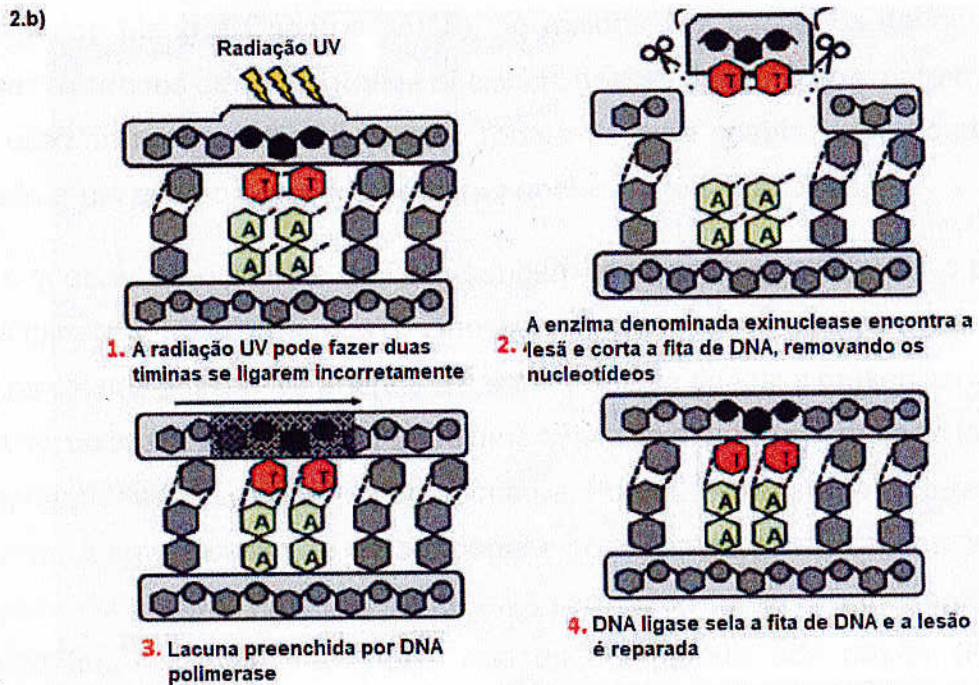
Paul Modrich, em 1959 (Figura 2a), relata um reparo de pareamentos incorretos, no qual as células eram capazes de corrigir erros de pareamento durante a replicação do DNA durante a divisão celular. Aziz Sancar, em 1996 (Figura 2b), demonstrou um mecanismo de reparo que age por meio da excisão de nucleotídeos, no qual as células agem em resposta a lesões causadas, por exemplo, por radiação ultravioleta ou induzidas quimicamente por substâncias mutagênicas. E, por fim, os experimentos de Tomas Lindahl, que se iniciaram a partir da década de 1970 (Figura 2c), demonstraram que durante o processo de degradação do DNA, mecanismos moleculares e um processo de reparo por guiado por excisão de bases, conseguiam reparar eficientemente um dano ao DNA (MENG e OSBORNE, 2015).

Figura 2- Prêmio Nobel de Química 2015



Experimento realizado por Paul Modrich, em 1959, onde foi observada uma correção do DNA por meio do pareamento errado entre as bases nucleotídicas.

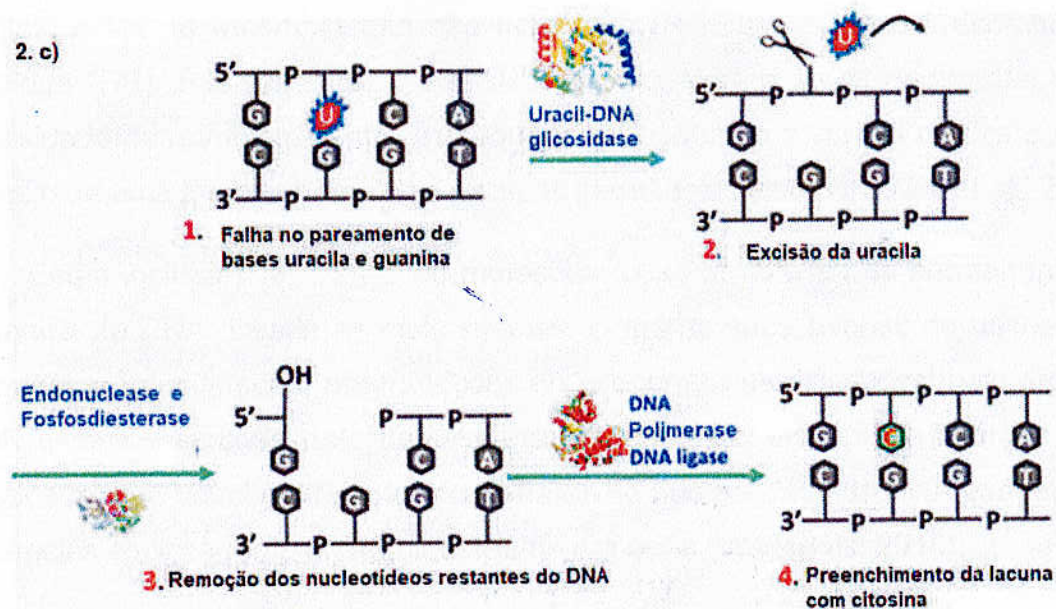
Fonte: (MENG e OSBORNE, 2015)



Experimento realizado por Aziz Sancar, em 1996 onde há um reparo do DNA da excisão de nucleotídeos por meio de lesões químicas e radiação.

Fonte: (MENG e OSBORNE, 2015)

2. c)



Experimento realizado por Tomas Lindahl onde foi visto o processo de degradação do DNA por meio de excisão de bases.

Fonte: (MENG e OSBORNE, 2015)

Segundo Meng e Osborne (2015), na maioria dos casos, os danos no DNA podem ser reparados devido à grande eficiência desses mecanismos, porém, quando um processo de reparo falha, durante o reparo de uma quebra na fita dupla, pode desencadear um evento que pode se tornar nocivo e até ser fatal.

As quebras na dupla fita de DNA também são geradas para iniciar o processo de recombinação homóloga dos cromossomos durante os estágios da meiose. Embora as células possam se adaptar a certos níveis de danos, a presença de quebra na dupla fita pode ser suficiente para que uma célula seja morta por meio da inativação de um gene ou desencadeamento do apoptose. Porém, se reparado incorretamente, podem levar a um processo de carcinogênese por meio de translocações, inversões ou deleções. As quebras na dupla fita de DNA são biologicamente importantes devido ao seu reparo ser mais trabalhoso, quando comparada aos outros (KHANNA; JACKSON, 2001).

Sabe-se que a maioria das células eucarióticas realizam o reparo de uma quebra na dupla fita de DNA, primariamente, por meio de duas vias geneticamente

distintas, a via de recombinação não homóloga (NHEJ) e a via de recombinação homóloga (HR). Basicamente, a via NHEJ repara extremidades quebradas sem a necessidade de homologia entre as sequências, enquanto a via HR realiza o reparo por meio de uma intensa homologia entre as sequências (ROTHKAMM et al., 2003).

Estão incluídas na classe de mutações todas as alterações permanentes na sequência de DNA. Desde as mais simples, como as substituições de bases como transições e transversões, até mutações onde ocorrem modificações mais drásticas no DNA, como inserções, deleções e rearranjos, como por exemplo, a inserção de um transposon, que usualmente adiciona milhares de nucleotídeos de DNA exógeno nas sequências codificadoras ou reguladoras de um gene (WATSON, 2015).

Na via de recombinação não homóloga, as extremidades da quebra da dupla fita são bloqueadas a partir do sentido 5' e mantidas próximas por um complexo formado por uma proteína de ligação e o DNA de cadeia dupla (dsDNA). Essa via propicia uma ligação direta das extremidades de uma quebra de fita dupla, entretanto, há ainda a possibilidade de que haja resultados errôneos, como por exemplo, inserções, deleções, substituições e translocações (CHAPMAN; TAYLOR; BOULTON, 2012).

Em contraste com a via NHEJ, a via por recombinação homóloga requer o uso de sequências que possuem homologia entre si para que ocorra o alinhamento das extremidades onde as quebras na dupla fita se encontram, antes da ligação. Essa via está mais presente após a replicação do DNA durante a fase S, quando há uma cromátide irmã replicada que poderá ser usada como molde para o reparo do DNA (APARICIO; BAER; GAUTIER, 2014).

As vias de reparo por NHEJ ou HR, basicamente, consistem em métodos de reparo endógeno de uma quebra na dupla fita do DNA. No entanto, esses mecanismos podem ser explorados e usados, a partir do momento em que, intencionalmente, são adicionadas quebras na dupla fita. Sendo assim, é necessário o uso das chamadas nucleases programáveis para que sejam adicionadas quebras em pontos específicos da fita de DNA (LISTIK; CARMO, 2016).

Devido aos grandes avanços na engenharia genética, novos métodos de edição do DNA estão se tornando cada vez mais utilizados, principalmente as nucleases artificiais que induzem quebras específicas na dupla fita de DNA, que têm sido usadas especialmente para a estimulação da via por recombinação homóloga. Recentemente, uma nova nuclease foi desenvolvida a partir de um sistema de defesa bacteriano que utiliza um RNA guia contra um DNA exógeno. Esse RNA guia, junto com a proteína Cas9, liga-se à sua sequência alvo de DNA complementar e realiza uma clivagem específica. Essa alteração de sequência de 20 pares de bases é capaz de redirecionar a Cas9 para determinados locais cromossômicos (AUER et al., 2013).

Assim, o sistema CRISPR-Cas emprega um sistema de defesa único, que envolve a incorporação de fragmento de DNA viral entre as repetições do CRISPR e, posteriormente, o uso dos produtos da transcrição dessas inserções, como sgRNA para clivar o DNA exógeno. Apesar de representar um genuíno método de defesa proveniente do sistema imune adaptativo, é de extrema importância que haja o conhecimento referente à distinção entre o CRISPR- Cas e o próprio sistema imune. Essa diferença se dá pela capacidade do CRISPR-Cas em modificar o genoma do organismo em resposta a uma infecção, promovendo uma memória imunológica (KOONIN; MAKAROVA, 2013).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Realizar uma revisão bibliográfica sobre os processos de reparo do DNA, com foco no sistema CRISPR-Cas9.

2.2 Objetivos Específicos:

1. Descrever as vias de reparo do DNA
2. Descrever a utilização das vias de reparo na terapia gênica por meio do sistema de nucleases programáveis CRISPR-Cas9
3. Realizar uma breve discussão sobre as abordagens clínicas em neoplasias e doenças cardiovasculares

3. METODOLOGIA

A dissertação propõe uma revisão bibliográfica descritiva, com abordagem teórica sobre as vias de reparo utilizadas na técnica do CRISPR-Cas9.

Para a pesquisa na literatura foram utilizados artigos científicos relacionados ao tema retirados e selecionados através do acesso em livros, revistas eletrônicas e base de dados. Os artigos utilizados foram filtrados entre os publicados durante os anos de 2000 a 2018, com conteúdo na língua inglesa e nacional, cujo tipo de pesquisa é aplicado.

4. DESENVOLVIMENTO

4.1 Fundamentos da Edição Gênica

O progresso no conhecimento sobre a genética básica das doenças tem possibilitado um melhor entendimento sobre os seus mecanismos, resultando em novas estratégias terapêuticas e tornando mais precisos os métodos de alteração do genoma de células eucarióticas (COX; PLATT; ZHANG, 2015).

Tecnologias que possibilitam a modificação do genoma são poderosas ferramentas para a área da biologia molecular. Os avanços na pesquisa sobre a edição do genoma nas últimas três décadas têm possibilitado o entendimento da relação do genoma e a fisiologia, e como uma pode influenciar a outra (ROCHA-MARTINS et al., 2015).

A terapia gênica, primariamente, envolve a manipulação do DNA ou RNA com o objetivo de tratar ou prevenir doenças nos seres humanos. Diversas são as estratégias utilizadas, compreendendo correções, deleções e substituições de genes responsáveis pela doença. A edição gênica com nucleases programáveis como alvo de atuação possibilita o manuseio do genoma de diversas maneiras. Diferentemente das ferramentas antecessoras de terapia gênica, nas quais se inseriam cópias de DNA exógeno para atingir o genoma ou núcleo celular, o que poderia ocasionar efeitos colaterais, foi desenvolvida uma nova ferramenta de edição, que utiliza um RNA guia, denominada CRISPR-Cas9 (XIAO-JIE et al., 2015).

Com as descobertas sobre os mecanismos de reparo do DNA, muitos campos de aplicação foram beneficiados, pois sabe-se que o reparo eficiente está diretamente associado ao envelhecimento e progressão de doenças como, por exemplo, doenças neurodegenerativas e câncer. Na ausência de equilíbrio entre os mecanismos de reparo, como resultado surge o estresse oxidativo que por fim, causa diversos danos ao DNA, quebras na fita única e/ou fita dupla, modificação de bases, entre outros (MENG e OSBORNE, 2015).

4.2 Início da Terapia Gênica – DNA Recombinante

Desde o século XIX, por meio dos experimentos de Johann Gregor Mendel, até os dias atuais, a evolução da genética possui um espaço de destaque na ciência. A partir do momento em que o genoma humano foi completamente sequenciado, a medicina moderna evoluiu e, a cada dia, importantes descobertas são realizadas, tais como o desenvolvimento de novos tratamentos de doenças (LINDEN, 2010; LANDER et al., 2016).

A partir de 1940, houve um grande impulso no ramo da genética e diversas descobertas sobre a natureza, composição química e propriedades do material genético foram propostas. Em meados de 1960, levantou-se a possibilidade de utilizar vírus para transferir genes aos seres humanos e, assim, curar doenças genéticas (LINDEN, 2010).

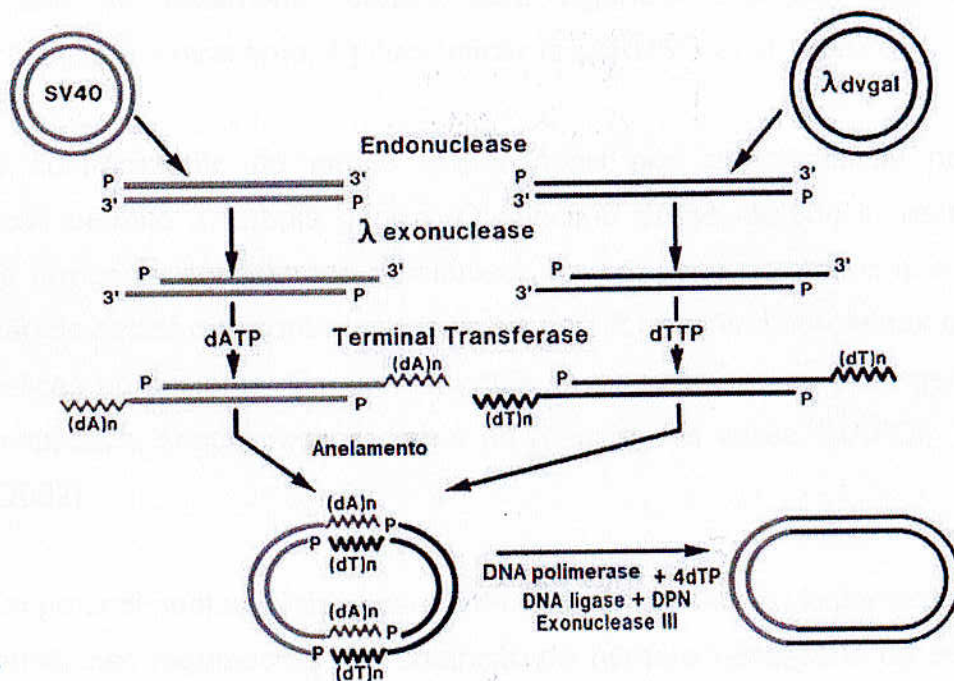
Uma década depois, Berg e colaboradores (1975) conseguiram manipular uma molécula de DNA criando, assim, a tecnologia de DNA recombinante. Naquele momento, as novas técnicas empregadas permitiram a combinação da informação genética de diferentes organismos, impulsionando uma área da biologia ainda pouco conhecida. A criação de um vetor seguro ao organismo humano foi essencial e encorajador pois, assim, poderiam reduzir os riscos biológicos e aprimorar a metodologia.

Os resultados de seus experimentos, representaram um grande passo na engenharia genética, ao criar a primeira molécula de DNA recombinante. Berg e colaboradores (1975) criaram um método que possibilitou unir duas moléculas de DNA *in vitro* utilizando um vetor, o SV40, uma abreviatura para vírus vacuolizante símio 40, um poliomavírus que pode ser encontrado em espécies de macacos e humanos e que possui certo potencial para o desenvolvimento de tumores.

Assim, desenvolveu-se um método que permitiu unir de forma covalente duas moléculas de DNA (Figura 3) envolvendo: (1) a conversão do DNA circular SV40 para a forma linear, (2) a adição de extensões nas extremidades 3' de uma das cadeias de DNA (3) adicionando outras extensões complementares na outra fita de DNA, (4)

junção das duas moléculas de DNA (5) preenchendo as lacunas com *Escherichia coli*, por meio da DNA polimerase e DNA ligase, retornando à estrutura circular. No final da década de 1980, o National Institutes of Health (NIH) aprovou o primeiro protocolo de teste de terapia gênica em humanos, onde seriam transferidos genes do sistema imune em pacientes em estados avançados de neoplasia (JACKSON; SYMONS; BERG, 1972; AZEVÊDO, 2009).

Figura 3 - Construção da Molécula de DNA Recombinante



Método utilizado para a construção da molécula de DNA SV40 – λ phage recombinante, unindo duas moléculas de DNA de modo covalente, permitindo a transferência de material genético por meio de vetores.

Fonte: (BERG; MERTZ, 2010)

A medicina moderna apresenta, a cada dia, novas descobertas em áreas destinadas ao desenvolvimento de novos tratamentos para doenças que até o momento são incuráveis. Essa expectativa na cura de certas doenças possui grande relação com a identificação dos genes responsáveis por sua patogênese e sobre o avanço no conhecimento da tecnologia do DNA recombinante, que assim permite o manuseio específico do genoma de forma cada vez mais segura (LINDEN, 2010).

A área que envolve a terapia gênica é relativamente nova na biomedicina, porém, vem apresentando grandes avanços, e acredita-se que represente uma possibilidade de tratamento efetivo para algumas doenças cujo tratamento convencional, até o momento, é pouco eficaz (LEANDRO et al., 2007).

O conhecimento de genes responsáveis por características normais ou patológicas permite a terapia gênica. O princípio desse método inicialmente visa substituir um gene, considerado defeituoso, por um gene normal, o que envolve a introdução de genes que serão responsáveis pela formação de proteínas que podem ser benéficas ao paciente. Em contrapartida, a remoção de um gene geralmente é mais complicada, sendo desnecessária na maioria das vezes (NARDI; TEIXEIRA; SILVA, 2002).

Os procedimentos básicos para a terapia gênica são: (1) isolamento do gene e suas sequências reguladoras; (2) obtenção do número necessário de células para colocar no paciente; (3) disposição de mecanismos de inserção de genes (vetores); (4) incorporação do gene ao genoma celular, e (5) a ausência de efeitos colaterais (AZEVEDO, 2009).

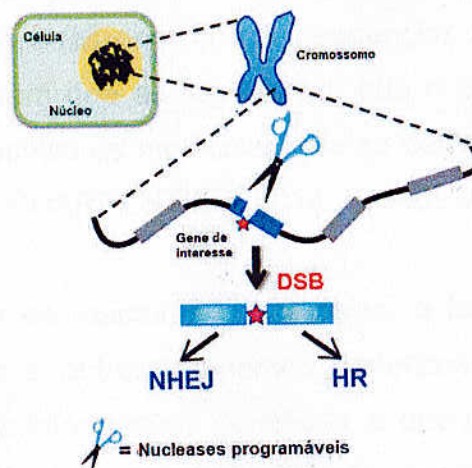
O desenvolvimento de vetores genéticos dependentes de vírus visou a resolução dos problemas iniciais da terapia gênica. O vetor ideal deve ser fácil de se produzir e não induzir nenhuma resposta imunológica ao vírus ou transgene pelo paciente. A ideia de usar vírus como veículos de transporte e indução de genes propõe o aperfeiçoamento da "entrega genética". A partir do início do século XXI, após o término do sequenciamento do genoma humano, foi possível realizar a comparação dos genomas com o apoio fundamental da bioinformática. Quando os pesquisadores, realizaram a primeira correção gênica em células *in vitro*, a ideia de utilizar vírus não

patogênicos para transportar genes gerou diversas pesquisas e nos anos de 1983 e 1984 foram propostos os primeiros sistemas de vetores a partir de vírus: retrovírus, adenovírus e vírus adenoassociados. Entretanto, apesar de serem boas propostas e apresentarem alta eficiência, ainda possuem algumas limitações como, por exemplo, a indução de uma alta resposta imune ou a inativação de um proto-oncogene (MENCK, 2007).

4.3 Nucleases Programáveis: CRISPR-Cas9

A edição gênica a partir de nucleases programáveis é um método da engenharia genética que utiliza as nucleases como “tesouras moleculares” (Figura 4) para, assim, atingir e digerir o DNA em seu local específico, no genoma. Sua ação é definida pela indução de ruptura ou quebra na cadeia dupla do DNA (DSB) no local-alvo que, posteriormente, é reparado pelos processos da via de recombinação homóloga ou não homóloga (OSAKABE; OSAKABE, 2014).

Figura 4- Nucleases Programáveis



Edição gênica utilizando nucleases programáveis que induzem uma quebra na dupla fita de DNA em regiões específicas do gene de interesse. Essas quebras são reparadas pelas vias de recombinação homóloga (HR) e via de junção de extremidade não homóloga (NHEJ).

FONTE: (OSAKABE; OSAKABE, 2014)

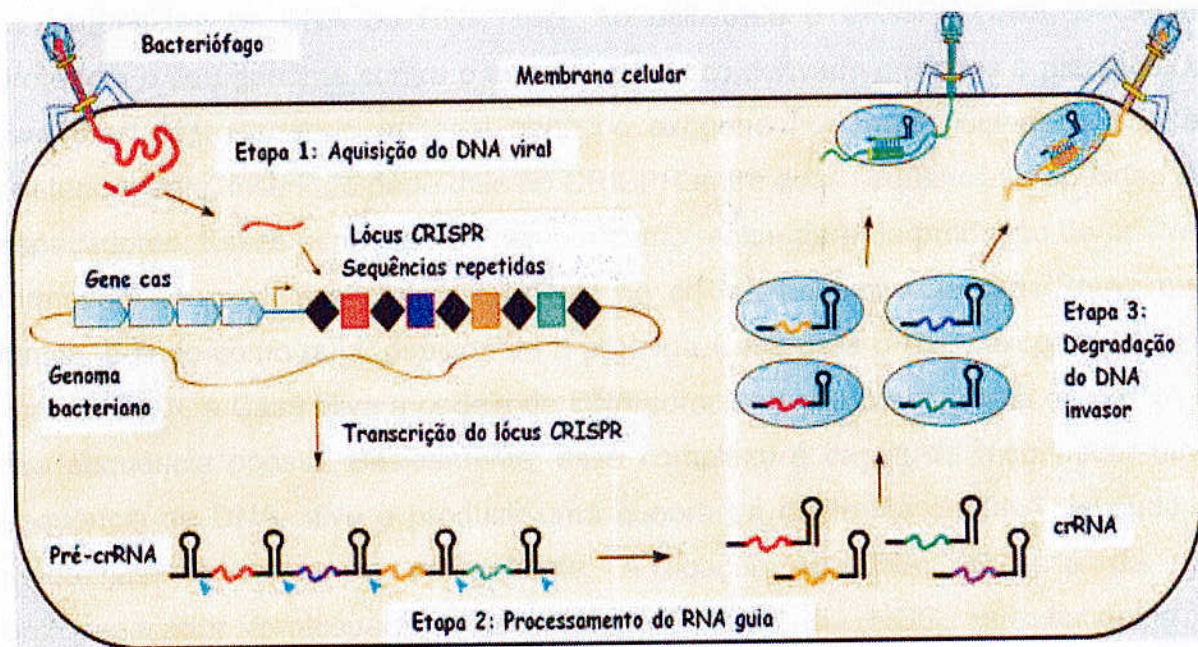
As modificações de sequência podem ocorrer nos locais clivados. Estão incluídas na classe de mutações todas as alterações permanentes na sequência de DNA, desde as mais simples, como as substituições de bases como transições e transversões até mutações onde ocorrem modificações mais drásticas no DNA, como inserções, deleções e rearranjos, como por exemplo, a inserção de um transposon, que usualmente adiciona milhares de nucleotídeos de DNA exógeno nas sequências codificadoras ou reguladoras de um gene. (WATSON, 2015)

A partir do momento em que a estrutura do DNA foi descoberta, mais especificamente, a estrutura em dupla hélice, diversas pesquisas foram iniciadas com a ideia de que havia a possibilidade de se realizar modificações em sítios específicos do genoma. A partir do DNA de bactérias, foi observado que as células possuíam uma maquinaria endógena responsável pelo processo de reparo de quebras na dupla fita de DNA (Figura 5). Assim, em meados dos anos 2000, o sistema CRISPR-Cas9 começou a ser investigado por alguns laboratórios de microbiologia e bioinformática. Esse sistema já havia sido descrito anteriormente por alguns pesquisadores japoneses, em especial Ishino e colaboradores, em 1987. Eles encontraram repetições curtas, interespaçadas com curtas sequências no genoma da bactéria *Escherichia coli* e observaram que as regiões em que o CRISPR estava presente possuíam um número específico de moléculas que se derivavam de genomas virais ou plasmídeos. (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; KHADEMPAR et al., 2018).

As bactérias podem ser bastante susceptíveis a fatores de estresse como infecção por bacteriófagos e outros elementos genéticos. Esses eventos podem resultar na transferência de informações genéticas, o que pode ser benéfico para a sua adaptação e sobrevivência como, por exemplo, os genes que codificam uma resistência a um antimicrobiano específico. Por outro lado, esse contato pode acarretar em vulnerabilidade celular, que pode resultar em comprometimento de população, como no caso dos plasmídeos. Tendo em vista uma maneira de se manter um equilíbrio, as células bacterianas desenvolveram alguns métodos de regulação a uma introdução de material genético a fim de resistir a uma infecção, como, por exemplo, o sistema CRISPR (RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012); (MCGINN; MARRAFFINI, 2018).

O sistema CRISPR-Cas9 é baseado em nucleases modificadas que são manipuladas por um RNA guia, que age por meio do emparelhamento de bases complementares para reconhecer sequências de DNA em regiões alvo (OSAKABE; OSAKABE, 2014).

Figura 5- Maquinaria do Sistema CRISPR-Cas9



Mecanismos de progressão do Sistema CRISPR-Cas9. Possui três estágios importantes que promovem a degradação do DNA viral: adaptação, expressão e segmentação. Por meio deles há a incorporação de um DNA exógeno, e posteriormente a seleção dos protoespaçadores, que são inseridos na extremidade inicial do CRISPR. Após isso, há a expressão e processamento do crRNA, agrupado na proteína Cas, que irá degradar o material genético.

Fonte: (The Doudna Lab, 2012)

A palavra CRISPR é um acrônimo para Grupos de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Espaçadas-CAS9 e consiste em um sistema de frações de DNA bacteriano constituídas por repetições de nucleotídeos. Faz parte de um dos mecanismos do sistema imune adaptativo bacteriano, que utiliza um RNA-guia e

nucleases para clivar estruturas genéticas exógenas, geralmente bacteriófagos ou plasmídeos (LISTIK; CARMO, 2016).

O aparecimento do sistema CRISPR- Cas9 como uma ferramenta de edição gênica tem revolucionado a forma como as características genéticas de muitos organismos têm sido manipuladas. A adaptação desse sistema para a forma de edição gênica consiste na utilização da endonuclease Cas9, capaz de criar uma lacuna entre as sequências de DNA ou RNA alvo. Ao utilizarem o CRISPR-Cas9, bactérias protegem o seu genoma contra o material genético derivado de fagos e plasmídeos invasores degradando o material genético exógeno por meio nucleases Cas e, posteriormente, inserindo parte dele no CRISPR entre duas sequências, repetidas ou espaçadores. Esses espaçadores servem como molde para da produção de crRNA, formando um complexo com a molécula de crRNA transativante (tracrRNA), que juntos, agindo como guia, direcionam a proteína Cas9 para o DNA exógeno. Ao se ligar ao DNA, a Cas9 cliva a cadeia de DNA complementar à sequência de crRNA e sua sequência oposta. Basicamente, esse complexo é capaz de reconhecer uma sequência de DNA- alvo e produzir uma quebra da dupla fita de DNA, levando a mudanças na sequência do genoma. A ligação ao DNA necessita de um protoespaçador (protospacer adjacente motif- PAM) 5'- NGG, que flanqueia a extremidade 3' do DNA alvo (LANDER; CHIURILLO; DOCAMPO, 2016; TORRES; PESSOA, 2018; KHADEMPAR et al., 2018).

Os espaçadores são regiões curtas que possuem sequências variáveis intercaladas entre as repetições curtas de DNA das sequências bacterianas CRISPR. Se uma infecção viral ameaça a célula bacteriana, o sistema CRISPR pode entrar em ação. Neste caso, os espaçadores serão derivados do DNA viral, resultante da memória adquirida pela célula bacteriana devido a um primeiro contato do DNA viral, que adiciona um espaçador à cadeia de espaçadores. Se por um acaso ocorrer uma nova infecção, o sistema de defesa CRISPR irá atuar, clivando qualquer sequência de DNA viral combinado a sequência espaçadora, protegendo a bactéria do ataque viral (NANOCELL, 2016).

O RNA guia Cas9, é uma ferramenta que age estimulando uma quebra na dupla fita de DNA em células eucarióticas. A nuclease Cas9 é direcionada para um *loci* por meio de uma sequência de 20 nucleotídeos, porém, se houver erro durante o

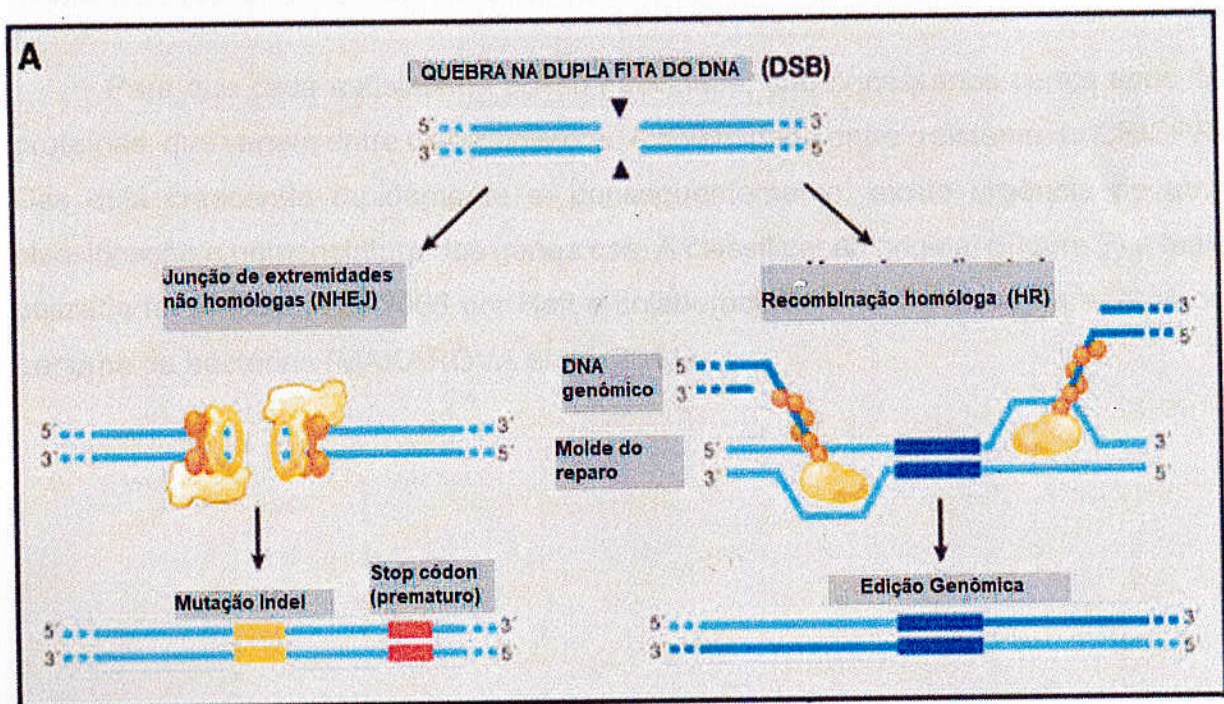
emparelhamento com o DNA alvo, há a chance de serem gerados processos de mutagênese (RAN et al., 2013).

Todas as células de indivíduos possuem em grande parte, em certas regiões o mesmo DNA e as diferenças funcionais entre cada tipo de célula estão altamente relacionadas às regiões do genoma que são transcricionalmente ativos. Assim, o RNA transcrito pode ser determinante para a identificação e distinção entre estados “saudáveis” e estados “doentes” de uma célula. O RNA possui uma grande papel no estado celular, portanto, seu processamento tornou-se muito importante. Após a fase de transcrição, os RNA codificadores de proteínas passam por diversas etapas que são mediadas por proteínas de ligação. Fatores capazes de realizar o reconhecimento do RNA podem ser responsáveis por gerar respostas como um sinal a detecção de uma “invasão” promovendo uma associação de proteínas sinalizadoras e seus substratos. Esse potencial motivou o desenvolvimento de sistemas de reconhecimento de RNA capaz de produzir uma ligação forte e específica a RNAs endógenos. O desenvolvimento de um RNA guia único (*single- guide RNA- sg RNA*), resultado da fusão do crRNA e tracrRNA possibilitou uma maior versatilidade desse sistema, adaptando-o para outros sítios genômicos pela modificação da sequência do vetor de expressão do sgRNA. Também há a possibilidade de usar diversas sequências de sgRNA em um único CRISPR, permitindo uma edição simultânea de vários sítios genômicos. (NELLES et al., 2015; TORRES; PESSOA, 2018)

O Sistema CRISPR-Cas bacteriano reconhece o material genético invasor por meio de RNAs guias para assim atingir o DNA invasor. Em bactérias e arqueas, o CRISPR-Cas constitui o núcleo funcional do sistema imune adaptativos que são compostos por nucleases associadas a um par de crRNA e tracrRNA (RNA de CRISPR transativante). Ambos os RNAs guiam as nucleases para o plasmídeo ou DNA invasor, por pareamento de bases para a clivagem. O sistema CRISPR-Cas do tipo II, proveniente de *S. pyogenes*, foi reaproveitado para o desenvolvimento sintético de uma combinação de um tracrRNA e crRNA, que é chamada de sgRNA (RNA guia “único”). O desenvolvimento do sgRNA foi necessária devido as diferenças entre os organismos procariotos e eucariotos. A maquinaria presente em procariotos exige uma ligação entre o crRNA e tracrRNA, que é indisponível em organismos eucariotos e isso tornava esta técnica irreprodutível (NELLES et al., 2015)

A clivagem realizada pela Cas9 segue duas vias de reparo do DNA. A primeira é a via NHEJ e, a segunda, a via HDR, sendo que ambas podem ser utilizadas para se obter uma alteração gênica (Figura 6). A via NHEJ pode ser usada para se obter genes *knockout* devido a sua capacidade de deixar uma “cicatriz” na forma de inserções e/ou deleções. Nos termos do reparo do DNA, as quebras da dupla fita estão relacionadas ao NHEJ, portando um número considerável de quebra da dupla fita de DNA pode ser responsável por uma larga escala de deleções no genoma. A via HDR pode ser considerada uma via alternativa de reparo que ocorre em menor escala e frequência quando comparada com a NHEJ. Por meio dela, pode-se obter uma mudança mais precisa no *locus*-alvo pela formação de extremidades 3' livres nas fitas danificadas, com a subsequente busca por sítios homólogos na fita de DNA do cromossomo, a qual é usada como fita molde para o processo de reparação (RAN et al., 2013).

Figura 6- Vias de Reparo do DNA mediadas pela Cas9



O reparo da quebra da dupla fita (DSB) é normalmente realizado por ambas vias de reparo endógeno. A via NHEJ, que não necessita de homologia, e a via HDR, via de reparo direcionada pela homologia.

Fonte: (HSU; LANDER; ZHANG, 2014)

O sistema CRISPR-Cas pode ser classificado em três tipos (I, II e III) a partir da combinação da comparação de uma proteína Cas, genes Cas e a organização genômica dos *loci* do CRISPR-Cas, sendo que para cada tipo existe um gene específico que permite a sua identificação (KOONIN; MAKAROVA, 2013).

Esses sistemas podem ser definidos por um *loci* genômico, constituído pela matriz CRISPR, correspondente a uma série de repetições de 20 a 50 pares de bases, separadas por um único espaçador de comprimento similar, seguido por uma região rica em sequências de AT (WRIGHT; NUÑEZ; DOUDNA, 2016).

A heterogeneidade entre os genes Cas e sua localização é a base principal para a sua classificação. O sistema do CRISPR-Cas é dividido em duas classes principais, onde cada uma delas possui tipos e subtipos. A primeira classe é encontrada nas bactérias e arquea, sendo composta pelos tipos I, III e IV, enquanto a segunda classe é encontrada apenas em bactérias, sendo composta pelos tipos II e V (MAKAROVA et al., 2015; KARIMIAN et al., 2019).

Para que cada subsistema possua atividade, são necessários certos tipos de proteínas, que variam entre os organismos. A diversidade entre o sistema do CRISPR-Cas está crescendo rapidamente e, conseqüentemente, existe urgência de uma classificação e nomenclatura dos genes *cas*. A classificação original (Figura 7) e mais utilizada foi proposta em 2005 por Haft e colaboradores e se baseava na análise do genoma de bactérias (MAKAROVA et al., 2011).

Figura 7- Classificação do Sistema CRISPR-Cas9

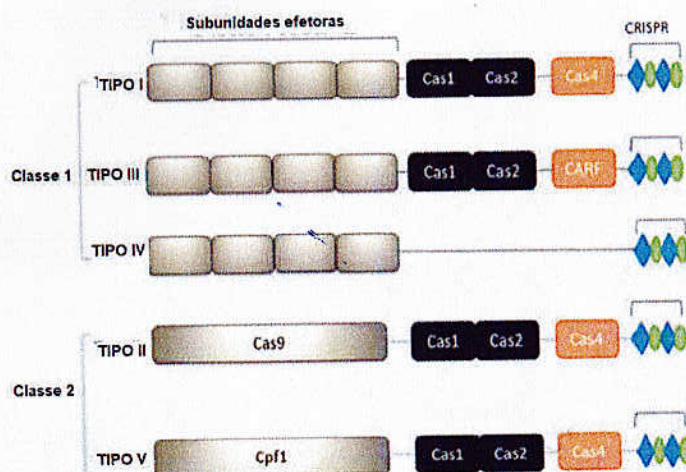


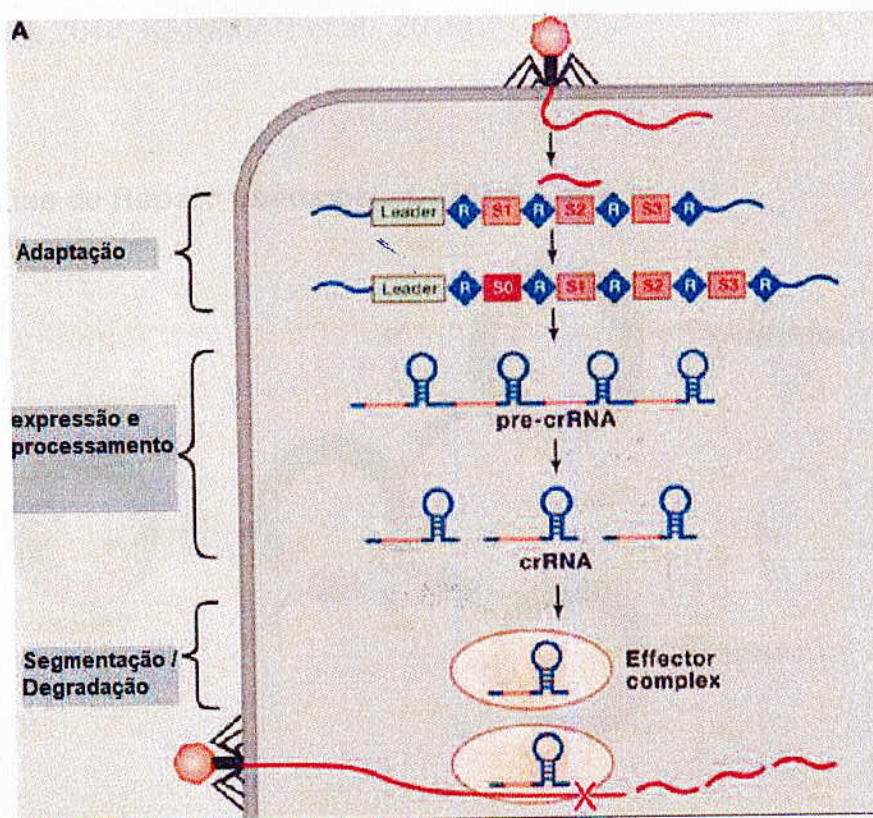
Figura ilustrativa do sistema de classificação do CRISPR/Cas. Losango azul: unidades de repetição. Círculo verde: sequência de espaçadores. Retângulo cinza: complexo modulatório efetor.

Fonte: modificado de (KARIMIAN et al., 2019)

O processo mediado pelo sistema CRISPR-Cas envolve três estágios (Figura 8), adaptação, expressão e segmentação, que podem ser separados em duas fases: a fase de processamento da informação, que abrange o estágio de adaptação, e a fase de execução, que abrange os estágios de expressão e segmentação (KOONIN; MAKAROVA, 2013); (NANOCELL, 2016).

O estágio de adaptação ocorre após a introdução de uma molécula de DNA exógeno. Uma vez introduzido uma molécula de DNA exógeno, a maquinaria seleciona protoespaçadores e os insere na extremidade inicial do loci do CRISPR. No estágio de expressão e processamento do cr RNA, o *loci* é transcrito e as sequências presentes nas repetições processam o pré-crRNA em crRNA, cada um possuindo o seu próprio espaçador. O crRNA, pode ser então agrupado com as proteínas Cas, formando o complexo efetor que atua no reconhecimento da molécula genética, o ácido nucleico exógeno e, assim, degradá-lo (WRIGHT; NUÑEZ; DOUDNA, 2016).

Figura 8 - Funcionamento do Sistema CRISPR-Cas9



Estágio do processo mediado pelo CRISPR-Cas9 (adaptação, expressão e segmentação) para que ocorra a degradação do ácido nucleico

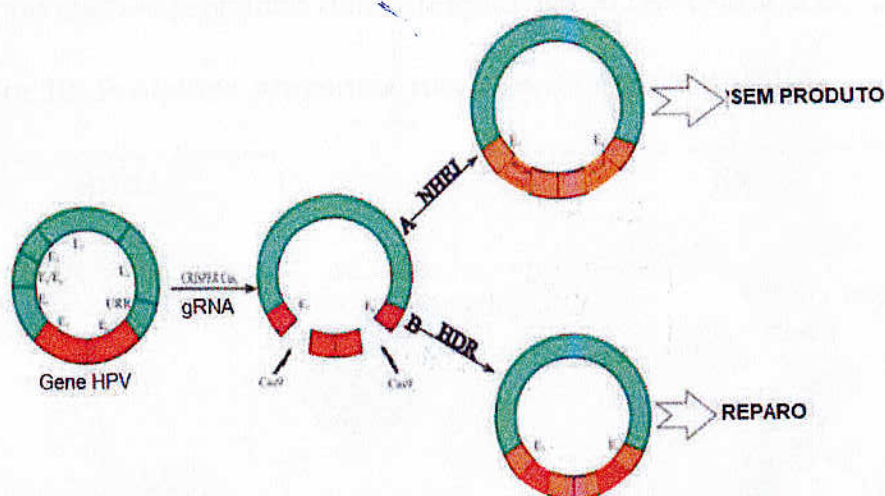
Fonte: (WRIGHT; NUÑEZ; DOUDNA, 2016)

4.4 Uso das Vias de Reparo do DNA pela CRISPR-Cas9

O sistema CRISPR-Cas9 opera a partir da realização de rupturas ou quebras diretas na fita dupla do DNA, por meio das vias de reparo mencionadas, NHEJ e HDR (Figura 9). A primeira via, NHEJ, introduz mutações que podem gerar problemas durante o processo de reparo, e na região onde ocorre a quebra na dupla fita haverá uma inserção ou deleção que causa os chamados *frameshift* ou *stopcodons* prematuros. Estes tipos de mutações são também denominados *indel*, e há uma alteração da região de leitura, acarretando um defeito na leitura das bases nucleotídicas. Enquanto isso, a via de reparação por recombinação homóloga, por meio de inserções mais precisas de pontos de mutação ou fragmentos desejados entre as sequências, leva a uma reparação por pareamento utilizando a homologia,

restaurando o gene alvo e produzindo um produto correto (LINS; MELLO; GONÇALVES, 2018; KARIMIAN et al., 2019).

Figura 9 - Vias de Reparo usada pela CRISPR-Cas9



Vias de reparo utilizadas pela CRISPR-Cas9, onde poderá ser obtido um produto reparado ou não.

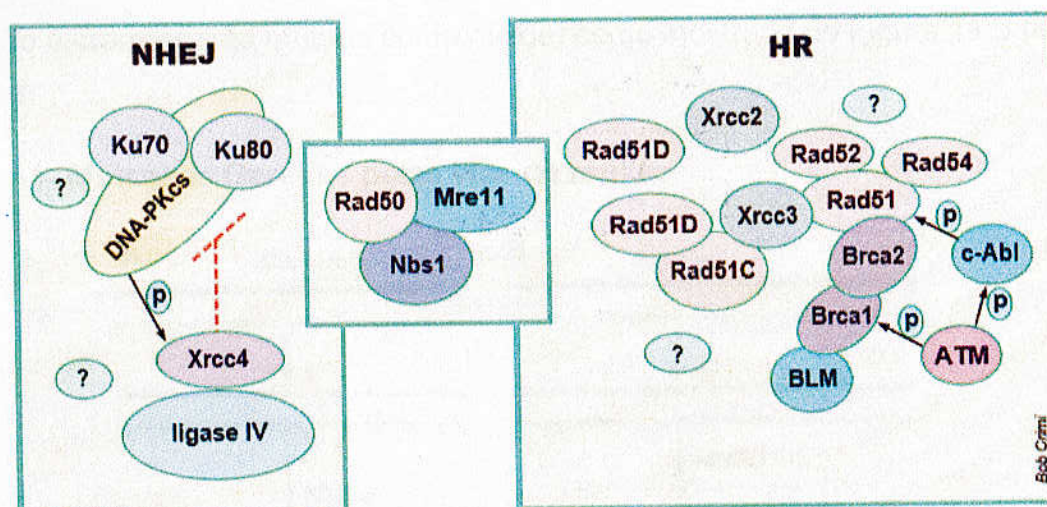
Fonte: (KARIMIAN et al., 2019)

Em grande parte dos casos, a via HDR proporciona os resultados desejáveis, enquanto a via NHEJ resulta em produtos indesejáveis, como mutações *indel* ou mutações incontroláveis. Em estudos realizados por Wu e colaboradores (2013), no grupo de camundongos tratados geneticamente por CRISPR-Cas9 e que passou pelo processo de reparo pela via HDR, observou-se a alteração genética correta, corrigindo-se os defeitos genéticos, enquanto que apenas uma pequena parte do grupo que passou pelo processo de NHEJ obteve um resultado de correção gênica satisfatória. Assim, a confiabilidade da metodologia aplicada por meio do CRISPR-Cas9 é devida ao aumento das taxas de processos mediados pela via HDR, que podem melhorar a eficiência deste tratamento, além reduzir efeitos genômicos prejudiciais (WU et al., 2013).

Sabe-se que a maioria das células eucarióticas realizam a reparação de uma quebra na dupla fita de DNA, primariamente, através de duas vias geneticamente

distintas, a via de recombinação homóloga (NHEJ) e a via de recombinação não homóloga (HR). Basicamente, a via NHEJ repara extremidades “quebradas”, sem a necessidade de homologia entre as sequências e envolve o complexo XRCC4-LIG4 e a proteína quinase dependente do DNA (DNA-PK), enquanto a via HR realiza a reparação por meio de uma intensa homologia entre as sequências, através de processos que utilizam proteínas Rad52 (Figura 10)(ROTHKAMM et al., 2003).

Figura 10- Proteínas presentes nas vias de reparo do DNA



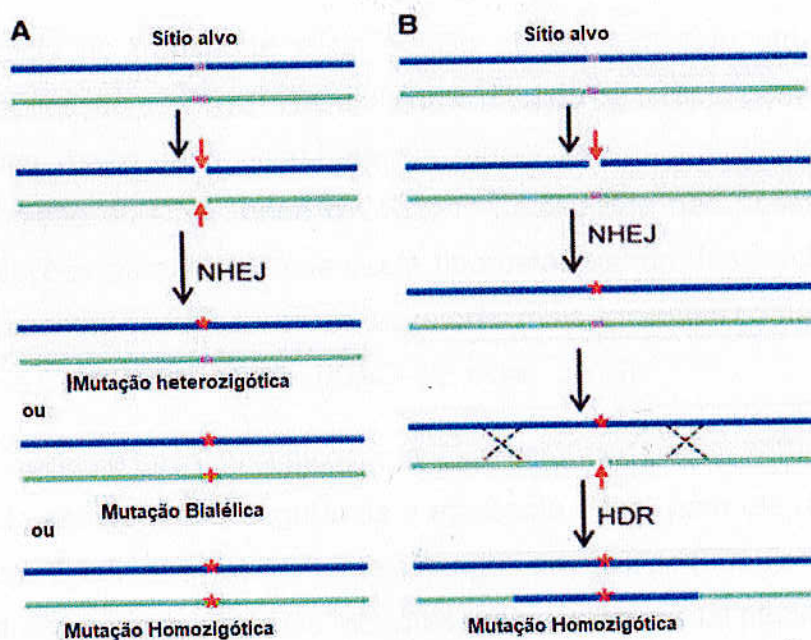
A via NHEJ: o complexo Ku se liga a quebra na dupla fita do DNA, seguida do recrutamento e ativação de DNA-PKs. A via HR: a reação catalisada pela Rad52 através das interações diretas.

Fonte: modificado de KHANNA; JACKSON, 2001

Proteínas, como a Rad51 na via HDR são usadas como alternativa devido a sua capacidade de unir as extremidades resultantes da quebra da dupla fita durante a fase inicial do processo de reparo, recrutando proteínas e fatores acessórios que ajudam a direcionar a recombinação gênica de forma homóloga. Em contrapartida, a via NHEJ é propensa a grandes erros: os heterodímeros Ku se ligam às extremidades resultantes da quebra da dupla fita, servindo como molde molecular para as proteínas de reparo associadas a ela. Assim, os *indels* adicionados aos filamentos complementares acabam sofrendo um reparo não totalmente correto devido a sua pouca homologia, levando a mutações no estilo *frameshift* e *knockout* gênico (HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

Após a quebra na dupla fita do DNA nas regiões alvo, ambos os cromossomos homólogos realizam o reparo pela via NHEJ, por meio do complexo Cas9/sgRNA, podendo produzir mutações heterozigóticas, homozigóticas (duas mutações idênticas, porém independentes) e bialélicas (mutações distintas) (Figura 11a). Também é possível obter uma mutação homozigótica por uma via que utiliza ambos mecanismos de reparo, NHEJ e HDR. Nesse processo, a quebra na dupla fita do DNA ocorre em duas regiões do cromossomo, produzindo má mutação. Então, a quebra na dupla fita do DNA é feita em outra região e seguida por um processo de reparo pela via HDR, utilizando o cromossomo mutado como molde, como mostrado na Figura 11 b (MA et al., 2016).

Figura 11- Mutações Geradas pelas vias de reparo



Após a quebra na dupla fita, os cromossomos realizam o reparo pelas vias NHEJ e HR, porém por meio delas também é possível obter certos tipos de mutações.

Fonte: (MA et al., 2016)

4.5 : Aplicações da CRISPR-Cas9

Até o momento, a edição gênica por meio do CRISPR-Cas9 tem sido usada para o tratamento da modulação de cânceres. Aplicações onde há a otimização dos sistemas de entrega, os vetores, e a eficiência e segurança desse sistema já despontam por um tempo (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

Um dos principais objetivos no uso da CRISPR-Cas9 é a remoção de mutações malignas e a substituição por sequências de DNA normais. Para que isso seja possível é ideal que haja um profundo conhecimento da fisiopatologia e biologia do câncer, mas o obstáculo mais significativo é saber como realizar o transporte da Cas9 em modelos *in vivo* bem como a forma mais segura para realizar testes humanos (KARIMIAN et al., 2019).

A eficiência no transporte e na edição gênica tem sido um ponto crucial relacionado à aplicação do CRISPR-Cas9 como medida de terapia gênica. Entretanto, a terapia gênica realizada no combate ao câncer requer metodologias de maior eficiência de edição do DNA, onde o CRISPR-Cas9 ainda não possui um alcance adequado. Soluções para problemas deste tipo estão sendo desenvolvidas e umas das principais apostas no futuro é o uso de vetores mais eficientes como, por exemplo, o sgRNA e uma Cas9 mais potente (XIAO-JIE et al., 2015).

Em pesquisas e ensaios clínicos, o uso de vetores de adenovírus associados é o mais utilizado devido a sua segurança e eficiência. Mas, para ele, é necessário o uso de *orthologs* Cas9, que basicamente são duas ou mais sequências homólogas de genes derivados de outros sistemas menores, pois a Cas9 usual possui um tamanho maior do que vetor suporta (XIAO-JIE et al., 2015; KARIMIAN et al., 2019).

A aplicabilidade mais simples do sistema CRISPR-Cas9 são as técnicas relacionadas à modificação de certas bases nucleotídicas em genes com relação alélica definida. Sendo assim, é importante que a relação da dominância mendeliana seja bem definida durante a terapia, considerando que o principal objetivo desta metodologia é atingir, em nível molecular, as funções gênicas para ativá-las ou inibi-las. Sabe-se também que modificações bialélicas também são possíveis e a aplicabilidade do CRISPR-Cas9 tem sido proposta para modificações no estágio embrionário em alguns modelos animais, onde é esperada a geração de organismos

contendo mutações alélicas e assim, ao efeito nocaute ou diminuição da expressão (AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2016).

Assim, nesse contexto, a partir do desenvolvimento da engenharia genética, novas possibilidades foram propostas em relação às tecnologias de edição gênica. O sistema CRISPR-Cas9 por ser capaz de remover direta e especificamente um fragmento de DNA do genoma, vem sendo amplamente utilizado para a modificação de genomas em diversos tipos celulares. Atualmente, há também diversas aplicações estudadas em doenças cardiovasculares (TIAN et al., 2019).

O câncer é uma doença caracterizada por grandes alterações genéticas e epigenéticas em oncogenes e supressores de tumor. Pesquisas em relação a essa doença possuem, geralmente, o objetivo de alcançar a manipulação de genes e células que seriam vitais para o seu desenvolvimento. O uso do CRISPR-Cas9, neste caso, é responsável pela pesquisa dos mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento da doença. Uma das estratégias que vem aumentando a eficiência do tratamento é a introdução de quebras na dupla fita do DNA em um *locus* genômico, podendo usar ambas as vias de reparo. Estudos destinados ao entendimento do papel de oncogenes e supressores tumorais têm utilizado modelos de ratos transgênicos fazendo com que superexpressem cDNA e RNA, porém, na maioria das vezes suas limitações podem levar a expressão de cDNA a níveis suprafisiológicos, onde há a possibilidade de gerar efeitos aberrantes sobre as vias de sinalização (SÁNCHEZ-RIVERA; JACKS, 2015).

Já o uso do sistema CRISPR-Cas9 em doenças cardiovasculares baseia-se no estudo de potenciais alvos moleculares que podem estar envolvidos no progresso da doença. Neste cenário, portando, faz-se o uso de ferramentas adicionais, como por exemplo, a bioinformática, bancos de dados de sequências genômicas, proteínas e polimorfismos. Após a análise e escolha do alvo, é necessária a revisão das funções dos éxons para que o RNA guia seja projetado adequadamente (AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2016).

As doenças cardiovasculares encontram-se entre as maiores causas de morbidade e mortalidade mundialmente. São influenciadas, principalmente, por conjuntos de modificações em fatores de risco, aqueles não controláveis e outros modificáveis, que interferem na doença por mudanças no estilo de vida, como por

exemplo, dieta e exercícios. Sabe-se que um dos principais problemas na manutenção e controle de uma doença cardíaca são os níveis elevados de LDL pela inibição da pró-proteína convertase subtilisina 9 (PCSK9), responsável pelo auxílio na degradação de receptores do LDL, o que provoca um aumento dos níveis plasmáticos do mesmo (RIQUE; SOARES; MEIRELLES, 2002; AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2016).

A perda da função da PCSK9 por meio do CRISPR-Cas9 com o uso de adenovírus como transportadores é responsável pela inibição da função do gene no fígado e, em certos estudos, foi comprovado que além da diminuição dos níveis de LDL, a susceptibilidade em formar uma placa aterosclerótica é menor devido à realização de nocautes em genes da ApoE (AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2016).

4.6 Questões Éticas

O desenvolvimento de mecanismos de edição genética a partir dos mecanismos moleculares do sistema endógeno imune adaptativo de organismos procariotos como, por exemplo as bactérias, tem resultado em diversas discussões, principalmente as relacionadas à bioética. Os avanços biotecnológicos podem ser motivo de grandes transformações na vida e saúde dos humanos e, em alguns casos, os benefícios obtidos por cada metodologia advêm de certas técnicas que possuem riscos desconhecidos, e isso os torna alvos de divergências e discussões. Um exemplo é o uso do CRISPR-Cas9 como objetivo de terapia gênica por meio da introdução de mutações específicas no genoma humano (LAUXEN; GOLDIM, 2015; GONÇALVES; PAIVA, 2017).

A possibilidade de alterar o código genético a partir de uma técnica simples e precisa como o CRISPR partiu inicialmente de bacteriófagos, sendo aplicada industrialmente na produção de queijos e iogurtes a fim de retardar processo de deterioração. Por meio de testes em camundongos, possibilitou-se a criação de macacos geneticamente modificados com o objetivo de investigar certas doenças que acometem seres humanos e, recentemente, a aplicação deste método em embriões humanos para corrigir e prevenir algumas doenças genéticas (LAUXEN; GOLDIM, 2015).

O principal argumento contra os métodos de edição gênica em embriões é o fato de implicarem na realização de modificações em linhagens germinativas. Em alguns países, esse tipo de alteração é proibido mesmo que conselhos de diversos países não entrem em consenso sobre a validação da edição gênica. Além disso, há o argumento de que a realização dessas modificações não seria consentida pelas gerações futuras, afetadas durante a concepção. Entretanto, a maior preocupação é a pela segurança das crianças. A responsabilidade de introduzir e aplicar à pesquisa genética uma nova metodologia é grande e a necessidade de reflexões acerca de seu uso em relação a irreversibilidade das ações deve ser levada em consideração (LAUXEN; GOLDIM, 2015; VASSENA et al., 2016).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O termo biologia molecular, proposto em 1938, por Warren Weaver destaca, e sua publicação a importância de possuir o conhecimento básico das estruturas moleculares presentes nos organismos, para assim compreender sua função fisiológica.

A possibilidade de manusear o genoma apenas foi possível com as primeiras descobertas sobre a estrutura do DNA. Isso possibilitou o levantamento de diversas hipóteses sobre como cada característica era passada por meio da hereditariedade. Assim, iniciou-se o processo de interpretação do genoma. Um grande avanço na área da biologia molecular e química foram os estudos feitos para o entendimento das vias de reparo endógeno por meio de leões genéticas. Isso permitiu que o conhecimento desenvolvido na criação da molécula de DNA recombinante fosse uma porta para que novas técnicas de edição genética fossem propostas.

O Sistema CRISPR-Cas9 é oriundo de um dos mecanismos do sistema imune adaptativo de bactérias que o utiliza para adquirir uma memória imunológica para posteriores infecções virais que possam ocorrer. Foi observado, então, que sua maquinaria trabalhava principalmente por meio de duas vias de reparo: NHEJ e HDR.

Ambas as vias foram intensamente estudadas por pesquisadores, incluindo Tomas Lindahl, Paul Modrich e Aziz Sancar, os quais foram ganhadores do Prêmio Nobel de Química em 2015 por suas contribuições nos estudos sobre o mecanismo de reparo. Essas vias, quando usadas intencionalmente, geram rupturas na cadeia dupla do DNA levando a correção genética ou supressão de certa característica. Para isso, necessitam ser usadas as chamadas nucleases programáveis, a Cas9, para que as quebras sejam realizadas em pontos específicos da fita de DNA.

Toda essa informação proporcionou novos caminhos para o tratamento de doenças que até então eram incuráveis ou possuíam diversas limitações em um tratamento efetivo. Por empregar um sistema de defesa, ocorre a incorporação de diversos fragmentos de DNA viral entre as repetições do CRISPR e os produtos dessas inserções por fim, acabam clivando o DNA exógeno. Ou seja, ela acaba por obter um reconhecimento da sequência-alvo, produzir a quebra na dupla fita, modificar o genoma e clivar o DNA-alvo.

O CRISPR-Cas9, portanto, é uma ferramenta promissora, com inúmeras aplicabilidades, sendo que há muitas novas possibilidades de tratamento a serem propostas. Alguns de seus principais usos compreendem o tratamento de neoplasias e de doenças cardiovasculares, onde há a remoção de mutações malignas por substituições de sequências. Para isso, ocorrem modificações em bases nucleotídicas ou mesmo a introdução de quebras na dupla fita do DNA em locais denominados alvos moleculares.

Por fim, a utilização de um mecanismo de edição genética desse nível entrou em diversas discussões éticas. O uso do CRISPR-Cas9 como método de terapia gênica é bastante criticado pela capacidade de mudança em linhagens germinativas de embriões, pois não seria algo consentido pelas gerações futuras, além de haver a possibilidade de ocorrer problemas durante o seu desenvolvimento, comprometendo a sua segurança.

6. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed;2017.

APARICIO, Tomas; BAER, Richard; GAUTIER, Jean. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. **Dna Repair**, [s.l.], v. 19, p.169-175, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.014>.

AREND, Marcela Corso; PEREIRA, Jessica Olivaes; MARKOSKI, Melissa Medeiros. The CRISPR/Cas9 System and the Possibility of Genomic Edition for Cardiology. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s.l.], p.81-83, 2016. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20160200>.

AUER, T. O. et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. **Genome Research**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.142-153, 31 out. 2013. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.161638.113>.

AZEVEDO, E, S. Terapia Gênica. *Rev Bioética*. 2009;5(2):5

CAETANO, Alexandre Rodrigues. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s.l.], v. 38, n. , p.64-71, jul. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-35982009001300008>.

BAUER, NICHOLAS C., CORBETT, ANITA H. DOETSCH, PAUL W. The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. *Nucleic Acids Research*, p. gkv1136, 2015.

BERG, P. et al. Summary statement of the Asilomar conference on recombinant DNA molecules. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 72, n. 6, p.1981-1984, 1 jun. 1975. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.72.6.1981>.

BERG, P.; MERTZ, J. E. Personal Reflections on the Origins and Emergence of Recombinant DNA Technology. **Genetics**, [s.l.], v. 184, n. 1, p.9-17, 1 jan. 2010. Genetics Society of America. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.109.112144>.

CHAPMAN, J. ross; TAYLOR, Martin r.g.; BOULTON, Simon j.. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 47, n. 4, p.497-510, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.029>.

COX, David Benjamin Turitz; PLATT, Randall Jeffrey; ZHANG, Feng. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 21, n. 2, p.121-131, fev. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3793>

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, [s.l.], v. 346, n. 6213, p.1258096-1258096, 27 nov. 2014. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1258096>.

GONÇALVES, Giulliana Augusta Rangel; PAIVA, Raquel de Melo Alves. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. **Einstein (são Paulo)**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.369-375, set. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-45082017rb4024>.

GREGORY, T. Ryan. Synergy between sequence and size in Large-scale genomics. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 6, n. 9, p.699-708, set. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1674>.

HSU, Patrick d.; LANDER, Eric s.; ZHANG, Feng. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. **Cell**, [s.l.], v. 157, n. 6, p.1262-1278, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>.

KARIMIAN, Ansar et al. CRISPR/Cas9 technology as a potent molecular tool for gene therapy. **Journal Of Cellular Physiology**, [s.l.], p.1-11, 30 jan. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.27972>.

KHADEMPAR, Saedeh et al. CRISPR-Cas9 in genome editing: Its function and medical applications. **Journal Of Cellular Physiology**, [s.l.], v. 234, n. 5, p.5751-5761, 26 out. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.27476>.

KHANNA, Kum Kum; JACKSON, Stephen P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.247-254, mar. 2001. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/85798>.

KOONIN, Eugene V.; MAKAROVA, Kira S. CRISPR-Cas. **Rna Biology**, [s.l.], v. 10, n. 5, p.679-686, 25 fev. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/rna.24022>.

JACKSON, D. A.; SYMONS, R. H.; BERG, P. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of Escherichia coli. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 69, n. 10, p.2904-2909, 1 out. 1972. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.69.10.2904>.

LANDER, Noella; CHIURILLO, Miguel A.; DO CAMPO, Roberto. Genome Editing by CRISPR/Cas9: A Game Change in the Genetic Manipulation of Protists. **Journal Of Eukaryotic Microbiology**, [s.l.], v. 63, n. 5, p.679-690, 15 jul. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jeu.12338>

LAUXEN, Elis Cristina Uhry; GOLDIM, José Roberto. Intervenções genéticas em seres humanos: aspectos éticos e jurídicos. **Barbarói**, [s.l.], p.202-226, 12 jul. 2015. APESC - Associação Pro-Ensino em Santa Cruz do Sul. <http://dx.doi.org/10.17058/barbaroi.v0i0.6861>.

LEANDRO, Carol Góis et al. Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, [s.l.], v. 13, n. 5, p.343-348, out. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-86922007000500012>.

LINDAHL, T. (2013). My Journey to DNA Repair. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 11(1), pp.2-7.

LINDEN, Rafael. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos Avançados**, [s.l.], v. 24, n. 70, p.31-69, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-40142010000300004>.

LINS, Amanda Aparecida; MELLO, Priscila Luiza; GONÇALVES, Flavio Buratti. Edição genética associada ao uso da nova técnica CRISPR/Cas9, ferramenta de defesa utilizada pelas bactérias contra DNA invasor. **Revista Eletrônica Científica da Uergs**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.358-367, 23 out. 2018. Revista Eletronica Cientifica da UERGS. <http://dx.doi.org/10.21674/2448-0479.43.358-367>.

LISTIK, E.; CARMO, A. C. V. As características dos mecanismos e sistemas de edição genômica. *Revista Acadêmica Oswaldo Cruz*, 10. ed., ano 3, n. 10, abr.-jun., 2016. Disponível em: revista.oswaldocruz.br/Content/pdf/Edicao_10_Listik_Eduardo.pdf

MAKAROVA, Kira S. et al. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, [s.l.], v. 9, n. 6, p.467-477, 9 maio 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2577>.

MAKAROVA, Kira S. et al. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, [s.l.], v. 13, n. 11, p.722-736, 28 set. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3569>.

MCGINN, Jon; MARRAFFINI, Luciano A.. Molecular mechanisms of CRISPR–Cas spacer acquisition. *Nature Reviews Microbiology*, [s.l.], p.1-6, 31 ago. 2018. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0071-7>

MENCK C, F, M. A, M Ventura. Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. *Rev USP*.2007;(75):

MENCK, C.F.M.; MENEGHINI, R. Prêmio Nobel de Química 2015: Os mecanismos de reparo de DNA. *Quim. Nova na Escola*, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 264-269, 2015.

MENG, H. OSBORNE, O. (2015). Linking, thinking & fixing: the story about the 2015 Chemistry Nobel Prize and the future of science. *Science Bulletin*, 60(23), pp.2071-2076.

NANOCELL, Instituto. CRISPR: A TÉCNICA DE ENGENHARIA GENÉTICA QUE PODE MUDAR O MUNDO! *Nanocell News*, [s.l.], v. 3, n. 7, p.1-4, 26 fev. 2016. Instituto Nanocell. <http://dx.doi.org/10.15729/nanocellnews.2016.02.26.002>. Disponível em: <<http://www.nanocell.org.br/crispr-a-tecnica-de-engenharia-genetica-que-pode-mudar-o-mundo/>>. Acesso em: 31 out. 2018.

NARDI, Nance Beyer; TEIXEIRA, Leonardo Augusto Karam; SILVA, Eduardo Filipe Ávila da. Terapia gênica. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.109-116, 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-81232002000100010>.

NELLES, David A. et al. Applications of Cas9 as an RNA-programmed RNA-binding protein. **Bioessays**, [s.l.], v. 37, n. 7, p.732-739, 16 abr. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201500001>.

O'BRIEN, S. J.. The Promise of Comparative Genomics in Mammals. **Science**, [s.l.], v. 286, n. 5439, p.458-481, 15 out. 1999. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.286.5439.458>.

OLIVEIRA, T. H. G., SANTOS, N. F. D., BELTRAMINI, L. M. O DNA: uma sinopse histórica. *Revista Brasileira de Ensino de Bioquímica e Biologia Molecular*, Artigo 1, Edição 01/2004, 24 fev. 2004.

OSAKABE, Y.; OSAKABE, K. Genome Editing with Engineered Nucleases in Plants. **Plant And Cell Physiology**, [s.l.], v. 56, n. 3, p.389-400, 20 nov. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcu170>.

RAN, F Ann et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 8, n. 11, p.2281-2308, 24 out. 2013. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2013.143>

RAN, F. ann et al. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. **Cell**, [s.l.], v. 154, n. 6, p.1380-1389, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>.

RIQUE, Ana Beatriz Ribeiro; SOARES, Eliane de Abreu; MEIRELLES, Claudia de Mello. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças

cardiovasculares. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.244-254, dez. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-86922002000600006>.

RICHTER, Corinna; CHANG, James T.; FINERAN, Peter C. Function and Regulation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR Associated (Cas) Systems. **Viruses**, [s.l.], v. 4, n. 10, p.2291-2311, 19 out. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v4102291>.

ROCHA-MARTINS, Maurício et al. From Gene Targeting to Genome Editing: Transgenic animals applications and beyond. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 87, n. 2, p.1323-1348, ago. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520140710>.

ROTHKAMM, K. et al. Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. **Molecular And Cellular Biology**, [s.l.], v. 23, n. 16, p.5706-5715, 31 jul. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.23.16.5706-5715.2003>.

SÁNCHEZ-RIVERA, Francisco J.; JACKS, Tyler. Applications of the CRISPR–Cas9 system in cancer biology. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 15, n. 7, p.387-393, 4 jun. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3950>.

SANTOS FILHO, Osvaldo Andrade; ALENCASTRO, Ricardo Bicca de. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.253-259, mar. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422003000200019>.

SCHEID, Neusa Maria John; FERRARI, Nadir; DELIZOICOV, Demétrio. A construção coletiva do conhecimento científico sobre a estrutura do DNA. **Ciência & Educação**

(bauru), [s.l.], v. 11, n. 2, p.223-233, ago. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-73132005000200006>.

IAN, Xueli et al. CRISPR/Cas9 – An evolving biological tool kit for cancer biology and oncology. **Npj Precision Oncology**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-8, 18 mar. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41698-019-0080-7>

TORRES, Cristiane Batista Bezerra; PESSOA, Wagner Soares. Células-tronco pluripotentes induzidas e edição de genes: avanços tecnológicos da pesquisa em medicina regenerativa e terapia gênica. **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.52-56, 8 jun. 2018. Universidade Federal do Piauí. <http://dx.doi.org/10.26694/jibi.v3i1.6258>.

VASSENA, R. et al. Genome engineering through CRISPR/Cas9 technology in the human germline and pluripotent stem cells. **Human Reproduction Update**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.411-419, 29 fev. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmw005>.

WATSON, J. D; BAKER, Tania., BELL, Stephen., GANN, Alexander., LEVINE, Michael., LOSICK, Richard. *Biologia Molecular do gene*. São Paulo. Artmed, 2015.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C.. THE STRUCTURE OF DNA. **Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology**, [s.l.], v. 18, p.123-131, 1 jan. 1953. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/sqb.1953.018.01.020>.

WRIGHT, Addison v.; NUÑEZ, James k.; DOUDNA, Jennifer a.. *Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering*. **Cell**, [s.l.], v. 164, n. 1-2, p.29-44, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.035>.

WU, Yuxuan et al. Correction of a Genetic Disease in Mouse via Use of CRISPR-Cas9. **Cell Stem Cell**, [s.l.], v. 13, n. 6, p.659-662, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.10.016>.

WU, Y.; LIANG, D.; WANG, Y.; BAI, M.; TANG, W.; BAO, S. et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPRCas9. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 6, p. 659-62, 2013

XIAO-JIE, Lu et al. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. **Journal Of Medical Genetics**, [s.l.], v. 52, n. 5, p.289-296, 24 fev. 2015. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102968>.

ZAHA, Arnado., FERREIRA, Henrique Bunselmeyer., PASSAGLIA, Luciane M.P. **Biología molecular básica**. Porto Alegre: Artmed, 2014